

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. T. Gress
Abteilung für Gastroenterologie und Endokrinologie



Einfluss von Glukose auf die HMGB-1-Regulation der β -Inselzellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt

von

Aysegül Depboylu

aus Lüdenscheid

Marburg 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 08.07.2014
Gedruckt mit freundlicher Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. B. Lankat-Buttgereit

1. Korreferent: Prof. Dr. J. Schäfer

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 High Mobility Group Box.....	2
1.2 Rezeptoren.....	3
1.3 Zielsetzung der Arbeit	6
2 Material und Methoden	8
2.1 Materialien	8
2.1.1 Chemikalien.....	8
2.1.2 Antikörper	10
2.1.3 Molekularbiologische Substanzen.....	11
2.1.4 Kits	12
2.1.5 Eukaryotische Zelllinien	12
2.1.6 Zellkultur.....	12
2.2 Zellbiologische Methoden.....	13
2.2.1 Zellkultur, Zellen passagieren, Zellen einfrieren.....	13
2.2.2 Proteinextraktion, Proteinbestimmung und Proteinausfällung	14
2.2.3 Zellfraktionierung	16
2.3 Molekularbiologische Methoden	17
2.3.1 2D-Gelelektrophorese.....	17
2.3.2 Westernblot	23
2.3.3 Proliferationsansatz MTT-Assay	27
2.3.4 GOD-PAP Methode	28
2.3.5 Herstellung der Pioglitazonlösung.....	29
2.3.6 Isolation von RNA.....	29
2.3.7 Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR).....	31
2.3.8 Gelextraction und A-tailing.....	33
2.3.9 Topo Cloning Reaktion und Transformation.....	33
2.3.10 Plasmidpräparation aus E. coli.....	33
2.3.11 Restriktionsenzymverdau.....	34
2.3.12 Stabile Transfektion (GenePORTER Transfection)	35

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AcN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propansulfat
cDNA	Complementary DNA
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT 1,4-	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
F	Forward
FCS	fluorescence correlation spectroscopy
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GPE	Gesamtproteinextrakt
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid
HRP	Horse-Radish-Preoxidase
IEF	isoelektrische Fokussierung
INS-1 Zellen	Insolium-1 Zellen
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	milli, 10 ⁻³
M	Molar, mol/l
μ	Mikro
mA	Milliampere
MALDI/ TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation/ Time of Flight
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
min	Minute

mRNA	Messenger ribonucleic acid
NaOH	Natronlauge
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIO	Pioglitazon
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PBS	Phosphat-gepuffertes Natriumchlorid (phosphate buffered saline)
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End Products
R	Reverse
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S.E.M.	Standardfehler vom Mittelwert
s, sec	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	mit Tris gepufferte NaCl-Lösung
TBST	mit Tris gepufferte NaCl-Lösung plus 5% Triton X-100
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin-Amino-2-(hydroxymethyl) -1,3-propandiol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TXNIP	thioredoxin interacting protein

1 Einleitung

Im Rahmen dieser Studie untersuchten wir die Effekte von Glukose und Glitazonen auf die β -Inselzellen des Pankreas von Ratten.

Wir stellten uns die Frage, warum unter erhöhten Glukosekonzentrationen insbesondere die β -Inselzellen apoptotisch werden. Wir untersuchten, durch welchen Stoffwechselweg dies geschieht. Das Wissen dieser Vorgänge könnte helfen, einen möglichen Therapieansatz zu entwickeln, um die Insulinresistenz der Patienten zu bessern und somit den Krankheitsverlauf zu mildern bzw. gegen die Apoptose vorzugehen.

Bereits im Jahre 1996 konnten O'Brien et. al die Apoptose belegen. Durch Low-Dose-Streptozocin (intraperitoneale Injektion von 40 mg/kg) wurde in C57B1/6 Mäusen Insulinmangel induziert. Am 5. Untersuchungstag wurden die β -Inselzellen apoptotisch. Am 11. Tag zeigte sich eine maximale Lymphozyteninfiltration in die Langerhans-Insel. Folglich kam es zu einer entzündlichen Infiltration von β -Inselzellen und die Anzahl der β -Inselzellen nahm ab (O'Brien et al. 1996). Die Apoptose der β -Inselzellen ist für die Entstehung des Diabetes mellitus verantwortlich (O'Brien et al. 1996). Allerdings wird Apoptose auch durch eine Hyperglykämie verursacht. In Zellen kommt es zum oxidativen Stress und zur Spaltung von Caspase 3, die die Apoptose induzieren (Zhou et al. 2013).

Eine weitere Studie stellte dar, dass die Proteinsynthese der β -Inselzellen von der Glukosedosis abhängig ist. Je höher die Glukosekonzentration ist, desto mehr β -Inselzellen gehen zugrunde (Hoorens et al. 1996). Die Regulation der Apoptose in den β -Inselzellen wird in den obigen Studien ansatzweise geschildert. Weiterhin ist der induzierende Agent der Apoptose unbekannt. Bisher gibt es wenige wissenschaftliche Erkenntnisse darüber, welche Proteine durch eine Hyperglykämie reguliert werden, die die Apoptose induzieren oder hemmen. Hiermit wäre eine Basis für die Identifizierung bzw. Untersuchung von Wirkstoffen gegeben, welche eine Apoptose der β -Inselzellen induzieren oder verhindern können. In dieser Studie beschäftigten wir uns mit der Frage: Was beeinflusst die Apoptose der Inselzellen? Im Rahmen der Versuche war unser Augenmerk auf die Proteine High Mobility Group Box1 (HMGB1) sowie Caspase 3 gerichtet. Bei Caspase 3 ist die allgemeine Erkenntnis das Vorkommen in zytosolischen inaktiven Proenzymen. Eine Aktivierung von Caspase 3 beschränkt sich hauptsächlich auf die Prozesse, in denen der Zelltod vorkommt (Garcia-Faroldi et al. 2013). Die Funktionen von HMGB1 werden im Verlauf

erläutert. Aufgrund der funktionellen Eigenschaften von HMGB1 und Caspase 3 und weil diese Proteine in Zusammenhang mit dem Diabetes mellitus bislang wenig erforscht waren, stellten sie einen interessanten Forschungsgegenstand dar. HMGB1 repräsentiert in dieser Arbeit den Hauptteil. Zu unserer Arbeit wurden die in der Behandlung des Typ-2-Diabetes eingesetzten Thiazolidinedione (Glitazone) hinzugezogen. Glitazone führen zu einer kontrollierten Glykämie und zeigen eindeutige pharmakologische Effekte auf die Folgeerkrankungen von Diabetes mellitus. Sie bessern die Insulinsensitivität, die Dyslipoproteinämie und führen zur Reduktion der Blutdruckwerte (Vasudevan et al. 2004). Ferner beschrieb Csaszar A. weitere bedeutende Eigenschaften wie anti-atherosklerotische, anti-inflammatorische und anti-koagulative Effekte (Csaszar A. 2011).

1.1 High Mobility Group Box

Das erste Mal wurde High Mobility Group Box1 (HMGB1) im Jahre 1970 als ein Protein erkannt. Es gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die die Fähigkeit besitzt, an DNA zu binden (Goodwin et al. 1973). HMGB1 erhielt die Bezeichnung High Mobility Group (HMG), weil es eine hohe elektrophoretische Mobilität im Polyacrylamidgel aufwies (Goodwin et al. 1977). HMGB1 zeigt im Polyacrylamidgel ein Molekulargewicht von ca. 30 kDA. Die Begrifflichkeit für HMG wurde 2001 neu klassifiziert, so dass die Benennung von HMG1 zu HMGB1 umgeändert wurde (Bustin 2001). HMGB1 kommt sowohl im Zytosol als auch membrangebunden vor. Im Jahr 1987 wurde es erstmalig im zellulären Nervensystem nachgewiesen und als Amphoterin beziehungsweise p30 bekannt (Rauvala et al. 1988).

HMGB1 besteht aus 215 Aminosäureresten, die in zwei DNA bindenden Domänen (A- und B-Box) und in einem negativ geladenen C-Terminus organisiert sind (Abb.1).

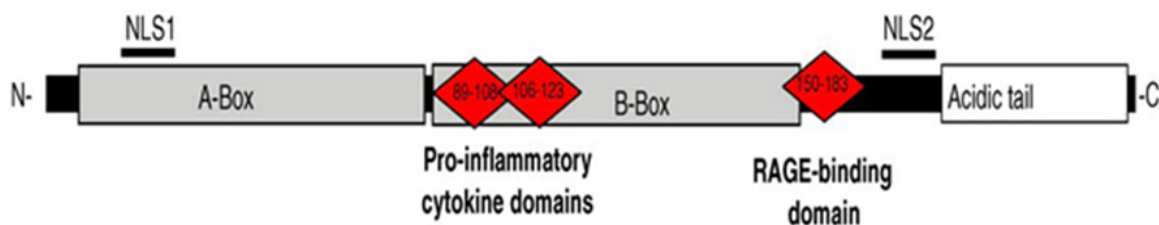


Abb. 1: Schematische Darstellung der strukturellen HMGB1-Charaktereigenschaften (aus Ulloa et al., 2006).

Die A- und B-Box sind in der Lage, voneinander getrennt an DNA zu binden (Bustin et al., 1990). Trotz der begrenzten Homologie der Aminosäuren haben die Domänen eine ähnliche Konformation. HMGB1, das mehrfach azetyliert im Zytosol vorliegt, transloziert mit Hilfe von zwei sogenannte Nuclear Localization Signals (NLS) 1 (Aminosäuren 28-44) und 2 (Aminosäuren 180-185) in den Zellkern. Durch Deazetylierung dieser Bereiche wird HMGB1 aktiviert und in den Zellkern transloziert (Bianchi 2004). Dort wirkt HMGB1 mit anderen Faktoren an der Transkriptionsmodulation vieler diverser Proteine mit. Bei einer Entzündung wird HMGB1 innerhalb der Kernlokalisierungssignale NLS1 und NLS2 azetyliert. Dies hat zur Folge, dass die Translokation verhindert wird und die hyperazetylierten Formen von HMGB1 sich im Zytosol anhäufen. Dort werden sie in sekretorische Lysosomen verpackt (Bonaldi et al. 2003; Gardella et al. 2002). Die Fusion dieser Lysosomen mit der Plasmamembran setzt HMGB1 in die extrazelluläre Umgebung frei.

1.2 Rezeptoren

Für das HMGB1 sind Rezeptoren beschrieben worden, welche schematisch in Abbildung 2 zu erkennen sind. Einer der interessanten Rezeptoren ist das RAGE, der als ein Multiligandrezeptor auf den glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Nervenzellen, dendritischen Zellen, T-Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird (Huttunen et al. 1999; Stern et al. 2002; Dumitriu et al. 2005). Dabei handelt es sich um mehrfach glykolisierte Proteine, wie sie bei Diabetes mellitus vermehrt entstehen (Stern et al. 2002). HMGB1 verfügt über eine 7-fach höhere Anziehungskraft zu RAGE (Hori et al. 1995). Eine Bindung von HMGB1 an TLR 2, TLR 4 und NF- κ B wurde ebenso nachgewiesen (Park et al. 2004).

TLR 2 und TLR 4 (toll-like receptor) gehören zum zentralen Teil des angeborenen Immunsystems und spielen bei Autoimmunerkrankungen eine Rolle. Nadatani zeigte in seiner Studie die Rolle von HMGB1 und seinen Rezeptoren in Wundheilungsprozessen im gastroenteralen Bereich. Er untersuchte, welcher Rezeptor (TLR 2, TLR 4 und RAGE) mit HMGB1 interagiert und zur Heilung des Magenulkus führt. Die Anwendung von HMGB1-Antikörpern förderte den Heilungsprozess, verzögerte die Expression von TNF. Ferner verbesserte der Mangel an TLR 4 und RAGE den Heilungsprozess. HMGB1 induziert mittels TLR und RAGE den Heilungsprozess (Nadatani et al. 2013).

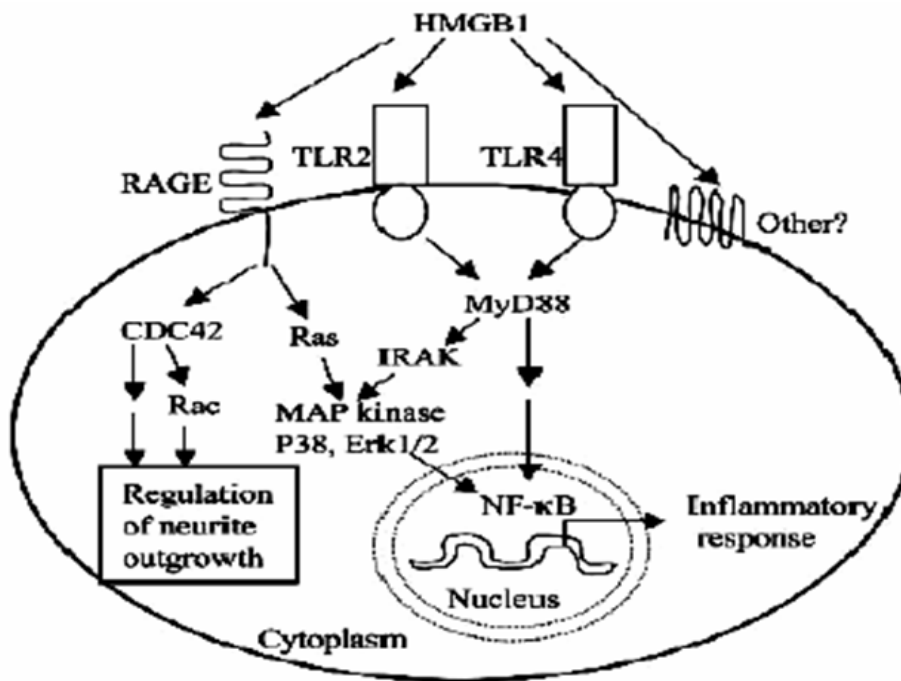


Abb. 2: HMGB1 Rezeptoren und deren Signaltransduktion (aus Yang et al. 2005).

Wirkungen von HMGB1

Lange Zeit wurde HMGB1 als Transkriptionsfaktor angesehen. Außerdem wird HMGB1 aus bestimmten Zellen sezerniert und fungiert als ein Ligand für RAGE (Receptor for advanced glycation end products). Somit aktiviert er bestimmte Stoffwechselwege, indem er eine wichtige Rolle bei Entzündungen und Tumormetastasen spielt (Murua et al. 2003). Es besitzt auch antiapoptotische, wachstumsfördernde und proin-flammatorische Eigenschaften. Zudem hat HMGB1 unter den Säugetieren eine extrem hohe Sequenzhomologie (Murua et al. 2003).

Transkriptionsfaktor

HMGB1 erscheint vorwiegend in azetylierter Form in den Zellen. Durch Deazetylierung wird HMGB1 aktiviert und transloziert in den Zellkern. Dort wirkt HMGB1 mit anderen Faktoren an der Transkriptionsmodulation vieler diverser Proteine mit (Ulloa und Messner 2006). In einer Studie wurde belegt, dass HMGB1-defiziente Mäuse immerhin lebend auf die Welt kommen, aber im Verlauf von 24 Stunden an einer Hypoglykämie tödlich enden. Die Erklärung für diese Tatsache ist eine Unterexpression des Steroid-Hormons mit resultierender Hypoglykämie. Auch mit dauerhaften Glukoseinfusionen überlebten diese Tiere

nur wenige Tage. Sie verfügten über keine Fettdepots und hatten eine Wachstumsstörung (Calogero et al. 1999).

HMGB1 spielt auch in der Tumorforschung eine besondere Rolle. In einer Arbeit wurde nachgewiesen, dass HMGB1 ein serologischer Biomarker in der Früherkennung des Magen-Karzinoms ist, sowohl zur Beurteilung der Tumorgenese und des Stadiums als auch zur Erwägung der Prognose (Hye et al. 2009). Bei den Untersuchungen war der HMGB1-Serumspiegel bei der Frühdiagnose eines Magen-Karzinoms erhöht. Die Sensitivität lag bei 71% und die Spezifität bei 67%.

Anti-Apoptose

HMGB1 hat antiapoptotische Eigenschaften durch Interaktion mit Bak (Brezniceanu et al. 2003). In Studien mit den Schwerpunkten Expression der Tumorzellen und Transfektion mit Bak-Plasmiden wurde der antiapoptotische Effekt von HMGB1 deutlich bewiesen. Anscheinend ist ein direkter Kontakt von HMGB1 zu den Apoptosekomponenten nicht notwendig. HMGB1 führte wie bei Bak zu einer Wirkungsminderung von proapoptotischen Faktoren (Brezniceanu et al. 2003). Es wurde auch nachgewiesen, dass eine Überexpression von HMGB1 verschiedene apoptotische Induktionen in Säugetierzellen hemmt. Eine Überexpression inhibiert die Caspase 3 und 9 Aktivität (Völp et al. 2006).

Proinflammatorisches Zytokin

In letzter Zeit wurde bekannt, dass HMGB1 an angeborenen und spezifischen Immunantworten teilnimmt. Passiv wird es aus nekrotischen Zellen freigegeben (Shu et al. 2010) oder es wird aktiv durch verschiedene Zelltypen produziert und ist für die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen verantwortlich (Scaffidi et al. 2002; Nagolva et al. 2012). HMGB1 interagiert mit RAGE und TLRs, die zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen führen. Die wichtige Rolle von HMGB1 ist die Vermittlung von Sepsis, nachdem alle proinflammatorischen Zytokine freigesetzt worden sind. HMGB1 ist als „late mediator of sepsis“ bekannt (Nagolva et al. 2012). HMGB1 ist in der Lage, Stammzellen zur Entzündungsumgebung anzulocken, um den Regenerationsprozess zu begünstigen. Es wird ein immunologischer Schutz aufgebaut, um den Erregern wirkungsvoll entgegenzuwirken (Palumbo et al. 2004).

Bei den apoptotischen Zellen erfolgt im Vergleich zu den nekrotischen Zellen keine Freisetzung von HMGB1. Die große Bedeutung von HMGB1 bei nekrotisierenden Entzündun-

gen ist bei HMGB1-defizienten Zellen zu sehen, die nur eine geringfügige inflammatorische Reaktion auslösen können (Scaffidi et al. 2002).

Aufgrund seiner vorwiegend intrazellulären Lokalisation kann das passiv freigesetzte HMGB1 immunologisch gesehen als nekrotischer Marker oder Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP) Molekül aufgefasst werden (Ulloa und Messmer 2006).

Die aktive Sekretion von HMGB1 erfolgt vorwiegend durch Zellen des Immunsystems. Durch die Stimulation proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL 1 und Endotoxine sezernieren Monozyten und Makrophagen HMGB1 (Wang et al. 1999). Bemerkenswert ist, dass HMGB1 im Vergleich zu anderen Zytokinen auf den primären Reiz hin nicht neu gebildet wird. Die zelluläre Lokalisation des Proteins hängt von seiner Azetylierung ab (Bustin et al. 1990; Bianchi 2004). Im Zytosol wird das HMGB1 durch die proinflammatorische Aktivierung der Monozyten verstärkt azetyliert und dort angesammelt. Die proinflammatorische Sequenz von HMGB1 (Aminosäure 89-108) befindet sich am Beginn der B-Box mit einer ausgeprägten Funktionsweise mit Zytokinen (Wey et al. 2010). Die A-Box kann konkurrierend die Bindungsstellen von HMGB1 an seine Rezeptoren inhibieren und die proinflammatorische Wirkung von HMGB1 und der B-Box abschwächen. Die A-Box wird demnach als ein spezifischer Antagonist von HMGB1 betrachtet (Gong et al. 2009; Yang et al. 2004).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich insbesondere mit dem Einfluss von Glukose auf die HMGB1 Regulation der β -Inselzellen. Folgende Zielsetzungen waren ausschlaggebend als Gegenstand für die Untersuchungen:

- Nachweis von regulierten Proteinen unter erhöhten Glukosebedingungen durch die 2D-Gel Elektrophorese an einer Ratten-Insulinomzelllinie (INS-1 Zellen);
- funktionelle Untersuchung der identifizierten Proteine;
- Validierung regulierter Proteine unter unterschiedlichen Glukosekonzentrationen und unter der Behandlung mit Pioglitazon mittels Western Blotting;
- in vivo Nachweis von HMGB1 in Seren von Typ 2 Diabetikern.

Da es zwischen HMGB1 und Hyperglykämie auf pathophysiologischer Ebene wenige Erkenntnisse gibt, können die hier durchgeführten Untersuchungen wesentliche Hinweise zu Therapiemöglichkeiten für Typ2-Diabetiker liefern, die zum Verständnis physiologischer sowie pathophysiologischer Mechanismen dienlich sein können.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

6-Well Platten, Nunc, Wiesbaden

7-beta-Hydroxycholesterol, Sigma, Deisenhofen

7-Ketocholesterol, Sigma, Deisenhofen

Acrylamid, Amersham Biosciences, UK

Acrylamid-Bis 37,5 : 1, Amersham Biosciences, UK

Agarose, low melting point, Sigma, Deisenhofen

Ammoniumhydrogencarbonat, Fluka BioChemica, Buchs, CH

Ammoniumpersulfat (APS), Serva, Heidelberg

Ampholyte pH 3 - 10, Servalyt, analytical grade 40 %, Serva, Heidelberg

Ampholyte pH 4 - 7 Servalyt, analytical grade 40 %, Serva, Heidelberg

Bio Rad Proteine Assay, Bio Rad, München

Biotinylated Anti-Mouse, Vector, Stuttgart

Bisacrylamid, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

Bovines Serum Albumin, Sigma, Deisenhofen

Bromphenolblau, Sigma, Deisenhofen

Calciumchlorid, Merck, Darmstadt

CHAPS (3-(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propansulfat), MP Biomedicals, Eschwege

Chem Mate Antibody diluent, Dako, Glostrup, Denmark

Conical Tube, disposable, Nunc, Wiesbaden

DAB + Chromogen (x50), Dako, Glostrup, Denmark

Detection Reagent 1 + 2, ECL, ECL Plus, ECL Advanced, Amersham Biosciences, UK

Dimethylsulfoxid (DMSO), Roth, Karlsruhe

Dithiothreitol (DTT), Serva, Heidelberg

DMEM Medium, low glucose, Bio West, Nuaille, Frankreich

Endothelial Cell Basal Medium, EBM Clonetics, Cambrex Bioscience, Walkersville

Endothelial Cell Growth Medium 2, Supplement Pack, EBM Clonetics, Cambrex Bioscience, Walkersville

Endothelial Cell Growth Factor, R & D Systems, Wiesbaden

Entellan, Merck, Darmstadt

Fetales Kälber-Serum (FKS) Sera Plus, PAN Biotech GmbH, Germany

Material und Methoden

Gellösung Rotiphorese 30, Roth, Karlsruhe

Gentamycin, PAA Laboratories, Linz

Gliclazid, Sigma Aldrich, Steinheim

Glucose liquicolor, Human Gesellschaft für Biochemica u. Diagnostica, Wiesbaden

Glutamin, Biochrom Ag, Berlin

HRP Substrate Puffer, Dako, Glostrup, Denmark

Iodacetamid, Merck, Darmstadt

Kollagenase A 0,2 % (0,2g/ dl), Roche, Mannheim

Mayers Hämalun, Merck, Darmstadt

Medium 199, Bio Whittaker, Verviers, Belgien

Methylenbisacrylamid, Amersham Biosciences, UK

Milchpulver, blotting grade, granuliert, Roth, Karlsruhe

Paraffin: Histo Comp tissue embeddigung medium, Vogel, Giessen

Penicillin, Streptomycin, Biochrom Ag, Berlin

Peroxidase blocking reagent (ready to use), Dako, Glostrup, Denmark

Pioglitazon, Sigma, Deisenhofen

Ponceau S, Sigma, Deisenhofen

Prestained protein marker, broad range, premixed format, New England Bio Labs Inc.,
Frankfurt

Proteinaseinhibitor "Proteinase Arrest" 100x, GBioscience, USA

Roti®-Blue, colloide Coomassie Färbung, Roth, Karlsruhe

Streptavidin Peroxidase, Dako, Glostrup, Denmark

TEMED, Sigma, Deisenhofen

Tri-Na-Citrat-Dihydrat, Merck, Darmstadt

Trypsin/ EDTA Clonetics, Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., USA

Trypsin Gold, mass spectrometry grade, Promega Corporation, Madison, USA

Wash Buffer DakoCytomation, Dako, Glostrup, Denmark

Die restlichen, nicht aufgeführten Chemikalien, stammten von Sigma oder Merck.

2.1.2 Antikörper

Die primären Antikörper, die bei der 2D-Gelelektrophorese (2D-Gel), Westernblot und Immunhistochemie eingesetzt wurden, sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Antikörper kamen aus Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz; Cell Signaling Technology, Upstate, USA.

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper

Primäre Antikörper	Kilo-Dalton (kDa)	Herkunft	Verdünnung
Anti-Aktin	55	Maus(polyklonal) Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California	1 : 5000
Anti-HMGB1/HMG-1	32	Kaninchen (polyklonal) Upstate Cell Signaling solutions, Lake Placid, New York	1 : 10000
Bcl-2	26	Maus (monoklonal) Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California	1 : 100 – 1 : 1000
Caspase 3	17, 19, 35	Kaninchen (polyklonal) Cell Signaling Technology, Inc.	1 : 1000
HMG-1/HMG-Y	32	Kaninchen (polyklonal) Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California	1 : 100 – 1 : 1000
SOD-1	23	Kaninchen (polyklonal) Cell Signaling Technology, Inc.	1 : 100 – 1 : 1000

2.1.3 Molekularbiologische Substanzen

1. Von BioLabs Inc. New England stammten:
 - **Enzyme:** Nde 1 (Neisseria denitrificans)
 - **PCR-Primer:**
Forward : HMG F: 5'-ATGGGCAAAGGAGATCCTAA-3' Tm: 55,3 °C
Reverse : HMG R1: 5'-TTATTAATCATCATCAT-3' Tm: 40,7 °C
Reverse : HMG R2: 5'-TTCATCATCATCATCTT-3' Tm: 43,1 °C
2. Von der Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland wurde der **Vektor pcDNA3.1/V5 - His-TOPO 5523 bp** bezogen.
3. Lipid, Dioleoyl-Phosphatidylethanolamin: **GenePorter Transfection Reagent** wurde von PeQlab Biotechnologie GmbH/Deutschland bezogen.
4. **PCR-Polymerasen** wurden von Roche Diagnostics, Mannheim und MBI Fermentas, St. Leon-Roth Deutschland bezogen.
5. **Bakterienstamm**
 - kompetente E. coli Bakterien (Top10) für Transformationen stammten von PeqLab Biotechnologie GmbH/Deutschland.
6. **Nährmedien für E. coli**
 - von DIFCO-Laboratoires, Detroit, USA kamen zur Herstellung von LB-Medium:
 - Bacto-Trypton;
 - Bacto-Yeast-Extrakt.

Von Greiner Frickenhausen, BRD, wurden unbeschichtete Petrischalen mit einem Durchmesser von 145 mm für LB-Platten verwendet.

2.1.4 Kits

Alle verwendeten Kits werden mit Liefernamen aufgeführt:

OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN (D)
Gel Extraction Kit	QIAGEN (USA)
NucleoBond Plasmid Purification Kit (maxi)	Machery-Nagel (D)
RNeasy Mini Kit	QIAGEN (USA)
TOPO®Cloning Reaction and Transformation	Invitrogen (D)

2.1.5 Eukaryotische Zelllinien

Die Zelllinie wurde aus Insulinomen von Ratten hergestellt, die INS-1 Zellen genannt werden.

Herkunft: Asfari et al. 1992, Endocrinology 130(1) 167-178.

2.1.6 Zellkultur

Für die Zellkultur wurden folgende Substanzen benötigt, die mit Liefernamen aufgeführt sind:

- RPMI 1640 (Roselle`s Memorial Institute Medium 1640, San Diego, USA)
- Trypsin (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA)
- Fetales Kälberserum (Sera Plus, Wiesbaden, D)

Von Falcon, Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA, stammten die Zellkulturplatten mit den Durchmessern 150 mm und 35 mm.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur, Zellen passagieren, Zellen einfrieren

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einem Laminar-Flow-Arbeitsplatz durchgeführt. Verwendete Lösungen und Medien wurden entweder autoklaviert oder steril filtriert mit Millipore Steritop. Verwendete Materialien waren steril verpackt oder wurden autoklaviert. INS-1 Zellen wurden im RPMI 1640 Medium (500 ml) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) (50 ml), 100 mM Natriumpyruvat (5 ml), 1M Herpespuffer (5 ml), 50 mM Mercaptoethanol (500 µl) und Gentamycin (G418) (2,5 ml) bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. INS-1 Klone wurden auch mit RPMI-Medium wie oben beschrieben bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Gentamycin dient zur Selektion und wirkt auf Bakterien, Pilze, Hefen, Protozoen und Säugerzellen. (Es ist eine sterile Fertiglösung (Konzentration 50 mg/ml)). Das Kulturmedium wurde jeden 2. - 3. Tag gewechselt.

Zellen passagieren

Die meisten Zelllinien haben eine 24 h Verdopplungsrate, so dass die Kulturschalen in kurzer Zeit konfluent sind. Um ein Ablösen bzw. einen Zelltod zu verhindern, werden die Zellen 1-2 x pro Woche bei einem konstanten Zeitabstand zum Experiment wie unten beschrieben passagiert:

- Medium absaugen,
- mit PBS waschen, PBS abziehen,
- Trypsin/EDTA auf die Zellen geben, gleichmäßig verteilen und 2 min im Brutschrank bei 37 °C inkubieren,
- mit dem Mikroskop kontrollieren, ob sich die Zellen vom Boden gelöst haben und dann das Trypsin mit 10 ml Medium inhibieren,
- Zellen mit Medium suspendieren, in Konusröhrchen umfüllen, bei 1200 rpm 3 min zentrifugieren,
- Überstand absaugen und mit 10 ml Medium resuspendieren,
- in neuen Petrischalen (10 cm Durchmesser) Zellen 1 : 5 oder 1 : 10 verdünnt aussäen.

Zellen einfrieren, Kryokonservierung

Bei der Kryokonservierung werden Zellen in flüssigem Stickstoff bis zu -80 °C eingefroren. Auf diese Art und Weise ist es gewährleistet, dass die Vitalität der Zellen fast uneingeschränkt bleibt.

Für das Verfahren werden folgende Schritte benötigt:

- INS-1 Zellen mit 10 ml Medium aufnehmen und 3 min bei 1200 rpm zentrifugieren,
- Überstand verwerfen,
- Zellpellet in 4,5 ml 10% DMSO in FCS aufnehmen, suspendieren, jeweils 1 ml in Kryoröhrchen überführen,
- langsam auf -80 °C abkühlen und nach einiger Zeit im liquiden Stickstoff lagern.

2.2.2 Proteinextraktion, Proteinbestimmung und Proteinausfällung

Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion wurden die kultivierten Zellen im Medium mit einem Zellschaber von der Schale gelöst und die entstandene Suspension in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 3 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Folglich wird der Überstand abgeschüttet und das Zellpellet mit 1 ml PBS suspendiert. In den Pausen wurde die Suspension immer wieder auf Eis gestellt.

Folgende Schritte müssen zur Vervollständigung durchgeführt werden:

- Suspension bei 1500 rpm 2 min zentrifugieren,
- Überstand abschütten, Zellpellet mit 500 µl PBS resuspendieren und 1 min bei 1500 rpm zentrifugieren,
- Überstand abschütten,
- 200 µl Proteinextraktionspuffer (s.u.) zum Zellpellet geben und suspendieren,
- mit Ultraschall die Zellen sprengen, Vorgang 4x wiederholen, dann auf Eis lagern.

Proteinextraktionspuffer wird folgendermaßen zusammengestellt:

- 1 ml PBS, 1 µl 0,5M EDTA, 10 µl Proteinase-Inhibitor, nach dem Vermengen auf Eis lagern.

Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Proteinkonzentrationsermittlung ist das BIORAD Protein Assay Reagenz in einfacher Konzentration verwendet worden. Dabei wurde der Proteinextrakt 1 : 100 mit dem Reagenz verdünnt (z. B. 5 µl Probe + 495 µl verd. Reagens). Die Extinktion wurde anschließend nach einer Inkubationszeit von 10 min photometrisch bei 595 nm mit dem Photospektrometer gemessen.

Proteinausfällung mit Aceton

Aceton führt in der Probe zur Proteinausfällung. In dieser Methode liegt der Vorteil in der schnellen Probenaufarbeitung. Man geht folgendermaßen vor:

- die gezüchteten Zellen von der Petrischale abschaben, die Suspension in ein Alkoniröhrchen überführen und 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren,
- 1 ml vom Mediumüberstand abpipettieren und in 5 Eppendorfgefäße gleichmäßig verteilen,
- in jedes Gefäß die vierfache Menge Aceton (800 µl) hinzupipettieren und 1 Stunde bei -20 °C inkubieren,
- dann die Gefäße 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen;
- Zugabe von 50 µl PBS-Puffer (s.u.) in das erste Eppendorfgefäß suspendieren und die Lösung in das zweite Gefäß transferieren;
- Lösung suspendieren, dann in das dritte Gefäß transferieren, diesen Vorgang bis zum letzten Gefäß wiederholen, so dass zum Schluss nur ein Eppendorfgefäß mit Proteinpellet übrig bleibt;
- Proteinbestimmung.

PBS-Puffer wird folgendermaßen vorbereitet:

1 ml PBS, 10 µl 0,5 M EDTA (Chelatbildner), 10 µl Proteinase-Inhibitor
nach dem Ansetzen direkt auf Eis lagern.

2.2.3 Zellfraktionierung

Damit die Zellen in ihre Bestandteile fraktioniert werden, muss zunächst ein Zellaufschluss erfolgen. Eine Möglichkeit des Zellaufschlusses ist die Zentrifugation, die wir für die Fraktionierung von Kern und Zytosol angewendet haben. Nach einer Beschleunigung werden Zellbestandteile nach Größe und Dichte getrennt.

Im Folgenden werden die Schritte der Zellfraktionierung aufgeführt:

- Zellen aus der Petrischale ausschaben, mit Medium in Konusröhrchen überführen;
- 2-3 min bei 1500 rpm in der Eppendorffzentrifuge zentrifugieren, Überstand abschütten, Zellpellet mit 1000 µl PBS waschen;
- zentrifugieren, Überstand verwerfen, mit 500 µl PBS waschen;
- zentrifugieren, Überstand verwerfen, Zellpellet mit 100-200 µl Puffer A (s.u.) aufnehmen und 25 min auf Eis die Zellen anschwellen lassen;
- in der Zeit die Zentrifuge zum Vorkühlen einstellen;
- Zellen 10 min lang bei 4 °C und 3600 rpm zentrifugieren;
- Überstand in SW60-Röhrchen überführen, dann mit der Ultrazentrifuge 30 min /SW60/27300 rpm/4 °C;
- Überstand (Zytosol) in ein Cup transferieren, Organellen mit 50-150 µl Puffer A suspendieren;
- Proteinbestimmung isoliert von Kern- und Zytosolfractionen.

Puffer A wird folgendermaßen zubereitet:

20 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 10 mM KCL, 10 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 M PMSF oder 1x Proteinaseinhibitor.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese ist eine Proteinanalytik. Sie kombiniert die isoelektrische Fokussierung mit der SDS-Polyacrylamidelektrophorese zur hochauflösenden Trennung komplexer Proteingemische in Einzelproteine im ersten Schritt nach Ladung und in einem zweiten Schritt nach Molekulargewicht.

1. Dimension:

Bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) werden die Proteine aus dem zu untersuchenden Extrakt nach sauren und basischen Aminosäurenresten aufgetrennt.

Für die isoelektrische Fokussierung werden so genannte Trägerampholyte verwendet, die frei beweglich in einem Röhrchengel vorkommen und bei der Anlage eines elektrischen Feldes einen pH-Gradienten formen.

2. Dimension:

Das Röhrchengel nach pH-Wert aufgetrennten und equilibrierten Proteinen legt man auf den oberen Rand des SDS-haltigen Polyacrylamidgels. Alles liegt in einer Pufferlösung. Nun werden die Proteine senkrecht zur ersten Dimension in einer zweiten Elektrophorese nach ihrer Größe aufgespalten. Kleine Moleküle bewegen sich uneingeschränkt von der Anode zur Kathode fort und erreichen schnell die abgewandte Gelkante. Große Moleküle werden ständig vom Gel gebremst und können sich kaum fortbewegen. Sobald die kleinen Proteine am Gelrand abgekommen sind, wird die Trennung der zweiten Dimension beendet. Die Proteine werden fixiert.

Die einzelnen Lösungen werden folgendermaßen hergestellt bzw. benötigt:

Isolektrische Fokussierung (IEF) Acrylamidlösung:

- 28,4% (w/v) Acrylamid, 1,6% (w/v) N', N'methylen Bisacrylamid

Gel overlay (Gelüberschichtung):

- 6,5 M Harnstoff

Sample overlay (Probenüberschichtung):

- 7 M Harnstoff, 0,8% Ampholyte pH 4-7 (Servalyt, analytical grade, 40%), 0,2% Ampholyte pH 3-10 (Servalyt, analytical grade, 40%)

Lysispuffer:

- 9,5 M Harnstoff, 4% (w/v) CHAPS, 10 mM DTT, 2% Ampholyte pH 4-7, 0,5% Ampholyte pH 3-10

Equilibrationspuffer I:

- 0,05 M Tris-HCL (pH 6,8), 0,25% DTT, 4% SDS, 15% Glycerol

Equilibrationspuffer II:

- 0,05 M Tris-HCL (pH 6,8), 25 mM Iodacetamid, 30% Glycerol, 6 M Harnstoff

Kathodenpuffer:

- 0,8 g NaOH auf 1000 ml Aqua dest. auffüllen

Anodenpuffer:

- 1000 ml Aqua dest., 670 µl Phosphorsäure (85% Orthophosphorsäure)

5 x SDS-Laufpuffer:

- 15,1 g Tris, 94 g Glycin und 5 g SDS auf 1 Liter Aqua dest. auffüllen, pH 8,3

SDS-Gel für zwei Glasplatten

Sammelgel:

- 2,8 ml 1 M Tris-HCL pH 6,8, 2,1 ml Acrylamidlösung, 15 ml Aqua dest., 80 µl SDS (10%), 40 µl TEMED, 400 µl APS

Trenngel (15%):

- 20 ml 1 M Tris-HCL pH 8,8, 25 ml Acrylamid, 5 ml Aqua dest., 400 µl SDS 10%, 500 µl APS, 50 µl TEMED

Dann wird das Trenngel gegossen. Die o.g. Komponenten werden in einem 50 ml Erlenmeyerkolben gemischt. Die Polymerisierung des Gels wird durch die Zugabe und Utermischung von 10 ml TEMED eingeleitet. Die gemischte Acrylamidlösung wird nun mit einer Pasteurpipette zwischen die Glasplatten der vorbereiteten Gelkammer bis auf die angebrachte Markierung pipettiert und mit wenig 50%igem Isopropanol überschichtet. Wenn das Trenngel polymerisiert ist, wird das Sammelgel gegossen. Die o.g. Komponenten

ten werden in einem 50 ml Erlenmeyerkolben gemischt. Zur Durchführung der Elektrophorese wird die Gelkammer unter Auffüllen mit Laufpuffer in die Elektrophorese-Apparatur eingebaut.

Die **IEF-Acrylamid-Röhrchengele** werden wie gefolgt hergestellt:

- Röhrchen, eventuell Kapillare säubern (Durchmesser 3,1 mm, Länge 16 cm);
- Röhrchen auf 12,5 cm markieren und mit Parafilm abdichten;
- Röhrchen in Caps setzen mit dem Parafilm nach unten;
- Gellösung für die Röhrchen vorbereiten (ausreichend für ein Gel):
6,5 M Harnstoff (0,45 g), 100 µl 40%ige Ampholyte pH 4-7, 25 µl 40%ige Ampholyte pH 3-10, 133 µl IEF-Acrylamid-Stammlösung, 100 µl 20%iges CHAPS, 334 µl Aqua dest.;
- Polymerisierungsstarter 0,4 µl TEMED und 8 µl APS zufügen (frisch zubereiten);
- die Gellösung vorsichtig schwenken, mit der Pasteurpipette aufziehen und die Röhrchen luftblasenfrei bis zur Markierung auffüllen;
- das Gel mit 130 µl Gel overlay überschichten und das Röhrchen mit Parafilm verschließen;
- für 4 Stunden oder über Nacht bei 4 °C polymerisieren lassen.

Isoelektrische Fokussierung

Für die bestmögliche Auftrennung eines Proteoms mit Hilfe der 2D-Technik müssen die entsprechenden Proteine möglichst vollständig isoliert werden (Auflösung von Komplexen, vollständige Entfaltung). Dazu dienen, speziell für Membranproteine, ungeladene bzw. zwitterionische Detergenzien (CHAPS), Chaotrope (Harnstoff) und Reduktionsmittel für Disulfidbrücken (DTT). Nach Vorbereitung der Röhrchengele beginnt der Schritt der isoelektrischen Fokussierung. Es wird, wie unten beschrieben, fortgefahren:

- vor Gebrauch des Gels Gel overlay abziehen und vom fertigen Lysispuffer 100 µl auf das Gel zum Equilibrieren geben und mit 20 µl Aqua dest. überschichten;
- 30 - 60 min inkubieren;
- zur Probenvorbereitung 30 µg Probe mit 100 µl Lysis-Puffer 1 Stunde zeitweise vortexen, bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend den unlöslichen Teil durch Zentrifugation (3 min bei 12.000 rpm) abtrennen;
- Kathodenpuffer vorbereiten: 0,02 M NaOH;

- Anodenpuffer vorbereiten: 0,01 M H_3PO_4 (1,67 ml 85% H_3PO_4 zu 2,5 l Aqua dest.);
- Dialyseschlauch zurechtschneiden (ca. 2 x 2 cm) und in Anodenpuffer einweichen;
- Lysispuffer und Wasser vom Gel absaugen und umgekehrt in die Halterung setzen;
- Parafilm abnehmen, Anodenpuffer auf das Röhrchen geben, darüber je ein Dialysemembranstück mit einem Gummiring fixieren, die Röhrchen wieder richtig gedreht ins Kammergestell einsetzen;
- die Probe auf das Gel auftragen, mit jeweils 20 μl Sample overlay bedecken und die Röhrchen vollständig mit Kathodenpuffer füllen und in die Kammer schieben;
- obere Pufferkammer mit Kathodenpuffer füllen;
- die Fokussierung erfolgt bei 4 °C (im Kühlraum) mit folgendem Elektrophoreseprogramm:
 - 30 min bei 200 V
 - 17,5 Stunden bei 750 V
 - 1 Stunde bei 850 V
 - 1 Stunde bei 1000 V
- die Gele mit Aqua dest. gefüllter Spritze aus den Röhrchen in eine Plastikschaale verdrängen;
- das basische obere Ende mit gesättigter Bromphenolblaulösung markieren.

Equilibrierung

Vor der zweiten Dimension werden die Gele nacheinander in Equilibrierungspuffer I und II für 20 min bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert.

SDS-PAGE

Als nächstes werden die SDS-Gele hergestellt. In der Regel sind 15%ige Polyacrylamidgele geeignet. Das Besondere ist die Benutzung einer an der Kathodenkammerseite schräg geschliffenen Glasplatte zur Aufnahme des IEF-Gels.

Folgende Vorgänge sind für die 2. Dimension notwendig:

- SDS-Gel für die zweite Dimension vorbereiten, über Nacht vollständig durchpolymerisieren lassen, um störende Adduktbildung mit Proteinen zu verhindern;
- LOW und TOP-Agarose auf 60 °C im Wasserbad erhitzen;

- der eingekerbte Spalt wird mit LOW-Agaroselösung im Sammelgelpuffer teils gefüllt und das Röhrchengel wird blasenfrei, mit der markierten Seite an den rechten Rand, in die Kerbe eingelegt;
- zur Fixierung das Röhrchengel mit warmer TOP-Agaroselösung überschichten;
- untere Kammer mit den Glasplatten in den 1 x SDS-Laufpuffer einsetzen;
- obere Kammer mit 1 x SDS-Laufpuffer füllen und den vorbereiteten Standard vorsichtig in die Vertiefung (Tasche) im Sammelgel pipettieren;
- Proben bei 50 mA 20 min einlaufen lassen, dann bei 120 mA 3-4 Stunden das Gel laufen lassen;

Die Trenndauer beträgt ca. 3,5 bis 4 Stunden.

Silberfärbung

Die Silberfärbung dient nach der gelelektrophoretischen Auftrennung im Polyacrylamid-Gel zur Darstellung der Proteine.

Für die Silberfärbung werden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

Thiosulfatlösung für Silverstain: 0,2% Natriumthiosulfat, 0,1 M Natriumacetat

Fixierlösung: 600 ml Aqua dest., 30% Ethanol und 10% Essigsäure

- das Gel in 120 ml Fixierlösung 15 min schüttelnd inkubieren, Fixierlösung absaugen, den Vorgang wiederholen;
- Gel in Thiosulfatlösung über Nacht auf dem Schüttler inkubieren;
- Gel in 100 ml Aqua dest. 10 min schüttelnd inkubieren, dann das Wasser absaugen;
- diesen Vorgang noch zweimal wiederholen;
- nach dem Waschen das Gel in 125 ml Silbernitratlösung geben und 25 min schütteln lassen;
- Gel 1x mit Aqua dest. waschen, nur kurz schwenken.

Silbernitratlösung wird folgendermaßen vorbereitet:

- 0,25 g Silbernitrat, 250 ml Aqua dest., 62,5 µl Formaldehyd. Erst Silbernitrat lösen, dann Formaldehyd dazugeben.

Entwicklung

Beim 1. Entwicklungsschritt reagiert das freie Silberreagenz ab (Lösung färbt sich dabei schwarzbraun). Beim 2. Schritt reagiert nur proteingebundenes Reagenz bis die Reaktion abgestoppt wird.

Die Herstellung der Entwicklerlösung:

- 10 g Natriumcarbonat, 400 ml Aqua dest., 200 ml Formaldehyd. Erst Natriumcarbonat lösen, dann Formaldehyd dazugeben.
- 50 ml Entwicklerlösung zum Gel geben, sobald der Entwickler braun wird, Lösung absaugen, diesen Vorgang wiederholen;
- den Vorgang nochmals wiederholen mit 100 ml Entwicklerlösung bis Signale auf dem Gel erkennbar sind;
- zum Stoppen der Färbung 10 ml konzentrierte Essigsäure auf das Gel geben;
- die Reaktion durch starkes Ansäuern beenden, was durch Bildung von Gasblasen (CO_2) beobachtbar ist, anschließend das Gel in Aqua dest. waschen;
- solange warten bis keine Gasblasen (CO_2) mehr beobachtbar sind (ca. 10 min);
- zur Dokumentation Gele zunächst einscannen und anschließend zwischen Cellophan-Folie trocknen lassen;
- damit sie nicht zerreißen, Gele zuvor in „Gelfix“-Lösung einlegen (mind. 20 min lang);

Gelfix-Lösung:

- 50% Ethanol und 2% Glycerin auf 1 Liter Aqua dest. auffüllen.

Präparatives Gel

Nach der 2. Dimension wird folgendermaßen vorgegangen: Gelvolumen bis 24 ml:

- nach der Elektrophorese Inkubation des Gels 60 min lang in 200 ml Fixierlösung und im Anschluss Inkubation für 2-15 Std. in 200 ml der Roti®-Blue Färbelösung.
- Gel in eine saubere Schale überführen. Gel auf dem Schüttler in 100 ml Waschlösung 5 min lang inkubieren lassen. Durch heftige Bewegungen können die Bereiche mit den ausgefallenen Farbstoffen in die Lösung überführt werden. Als nächstes wird die Waschlösung abgesaugt, das Gel gescannt. Anschließend werden die Proteinbanden geschnitten: eine interessierende Proteinbande mit einem Skalpell ausschneiden, in

sehr kleine Stücke teilen (ca. 2 mm x 2) und in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß überführen. Im Anschluss wurden die Proben zur Identifikation versandt.

- Zum Trocknen des Gels: Gel auf dem Schüttler 30 min lang in 100 ml Trocknerlösung inkubieren und abschließend zwischen Cellophan austrocknen lassen.

Die Herstellung der Lösungen:

Fixierlösung (100 ml):

- 79 ml Aqua dest., 1 ml o-Phosphorsäure 85% und 20 ml Methanol.

Roti®-Blue Färbelösung (100 ml):

- 60 ml Aqua dest. und 20 ml Methanol mischen;
- Unter Rühren 20 ml Roti®-Blue (5 x Konzentration) dazugeben.

Waschlösung (100 ml):

- 25 ml MeOH 99,8%, 75 ml Aqua dest.

Trocknerlösung (100 ml):

- 10 ml Glycerin 99,5%, 20 ml Ethanol, 70 ml Aqua dest.

2.3.2 Westernblot

Vorab wird ein Gemisch aus Proteinen in der Trägersubstanz entsprechend der Größe und Ladung aufgetrennt. Zuerst werden die zu analysierenden Proteine mit einem Polyacrylamid-Gel in separate Proteinbanden isoliert. Nun wird beim Westernblot ein elektrisches Feld angelegt, das senkrecht zum Polyacrylamid-Gel positioniert ist. Somit bewegen sich die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran. Aufgrund hydrophober Interaktionen bleiben die Proteine an der Membranoberfläche hängen. Jetzt sind die Proteine bereit, um Antikörper aufzunehmen. Nach diesem Arbeitsschritt wird an das Protein angelagerte SDS ausgewaschen. Es erfolgt nun die Identifizierung der Proteinbanden unter Anwendung von spezifischen Antikörpern, die an die jeweiligen spezifischen Stellen anhaften. Unspezifisch gebundene Antikörper werden mithilfe von bestimmten Puffern beseitigt.

SDS Gelelektrophorese

Für die Gelplatten werden Pufferlösungen benötigt, die folgendermaßen hergestellt werden müssen:

Puffer:

10 x SDS-Laufpuffer:

- 250 mM Tris Base, 1,92 M Glycin, 1% SDS

4 x SDS Probenpuffer:

- 2 g Tris-HCl, 25 mg Bromphenolblau, 25 ml Aqua dest., mit Glycerol auf 45 ml auffüllen, pH 6,8 einstellen, 5 ml 20%ige SDS-Lösung

Für zwei Gelplatten

Trenngel (15%):

- 6 ml Tris-HCL (pH 8,8), 7,5 ml Acrylamid, 1,5 ml Aqua dest., 120 µl SDS, 15 µl TEMED, 150 µl APS

Stop-Gel:

- 500 µl Trenngelpuffer, 1,2 µl TEMED, 120 µl APS

Sammelgel:

- 280 µl Tris-HCL (pH 6,8), 210 µl Acrylamit, 1500 µl Aqua dest., 8 µl SDS 10%, 4 µl TEMED, 40 µl APS

Ladepuffer:

- 40 µl 1 M DTT, 60 µl 4 x SDS Probenpuffer

Um das Gel zu gießen, folgende Reihenfolge beachten:

- saubere Glasplatten (mit Ethanol reinigen);
- Stop-Gel gießen;
- Trenngel bis ca. 5 mm unterhalb der Probentaschen gießen;
- sofort Sammelgel bis zum oberen Rand der Glasplatten gießen;

- Kamm luftblasenfrei einstecken;
- Gel ca. 1 Stunde aushärten lassen.

Die Proben werden folgendermaßen vorbereitet:

- 25 µg Probe in 10 µl Aqua dest.;
- Zufügen von 5 µl Ladepuffer;
- Erhitzen für 2 min bei 95 °C;
- Abschrecken auf Eis und 5 min Zentrifugation bei 1000 rpm.

Gel-Lauf:

- Aufbau der Elektrophorese;
- Einfüllen von 1 x SDS Laufpuffer;
- Aufladen von Proben und entsprechendem Standard;
- Stromstärke: Lauf des Gels auf 60 V, sobald die Proben im Trenngel sind, Voltzahl auf 120 V erhöhen;

Westernblot

Folgende Puffer werden vorbereitet:

Puffer:

10 x Blotting-Puffer:

- 100 ml Laufpuffer ohne SDS, 200 ml Methanol, 700 ml Aqua dest.

10 x TBS:

- 24,2 g Tris Base, 80 g NaCl, 15 ml HCl (37%ig), pH 7,6 einstellen (TBS)

1 x TBST:

- 100 ml TBS (10 x), 900 ml Aqua dest., 1 ml Tween 20

Blocking-Puffer:

- 50 ml 1 x TBST, 2,5 ml Magermilchpulver (5%)

Blot wird folgendermaßen zusammengebaut:

Der Aufbau erfolgt in einer mit Blotting Puffer gefüllten Schale von der Kathode zur Anode in dieser vorgegebenen Reihenfolge:

- Schwamm, Pappe, Gel, Nitrocellulose-Membran, Pappe, Schwamm.

Zwischen Schwämme und Pappe wird das Gel mit Nitrocellulose-Membran einspannt und in die Blotkammer befördert. Blottingpuffer in Kammer einfüllen und Eis dazugeben. Bei 4 °C die Proteine 1 h lang auf die Nitrocellulose-Membran unter 300 mA pro Kammer blotten. Hierunter versteht man die Übertragung von Proteinen auf die Trägermembran (Blotting).

Nitrocellulosemembran Färbung:

- die Nitrocellulose-Membran wird für ca. 5 min mit Ponceau S gefärbt;
- dann mit Aqua dest. soweit entfärben bis die Banden zu sehen sind.

Im Folgenden wird die Primärantikörper-Reaktion durchgeführt:

Für die Antikörper Reaktion folgende Schritte beachten:

- NC-Membran 2-4 Stunden in Blocking-Puffer auf einem Kippschüttler blocken;
- Zugabe des Primärantikörpers;
- Inkubation bei 4 °C auf einem Kippschüttler über Nacht;
- 4 x 10 min waschen mit TBST;
- Zugabe des Sekundärantikörpers (HRP gekoppelt);
- Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler;
- 4 x 10 min waschen mit TBST.

Zur Detektion werden folgende Schritte durchgeführt:

- Vorbereitung der ECL-Lösung;
- ECL-Lösung auf die Membran aufbringen und 1 min lang einwirken lassen;
- Restliche ECL-Lösung abtropfen lassen, Membran in Folie einpacken und in die Filmkassette überführen;
- Herstellung des Röntgenfilms in der Dunkelkammer (10 sec, 1 min. und bis 1 Stunde).

Für die β -Actin Detektion sind folgende Schritte notwendig:

- nach dem Exponieren NC-Membran 2-4 min mit TBST auf dem Kippschüttler waschen;
- β -Actin-Antikörperlösung: 6 ml Blocking-Puffer, 1,2 μ l anti- β -Actin Antikörper (1 : 500);
- NC-Membran über Nacht bei 4 °C in β -Actin-Antikörperlösung inkubieren;
- dann 3 x 15 min mit TBST waschen;
- 2 min in normalem ECL inkubieren;
- Membran in Folie einschlagen und exponieren (5 und 15 sec).

2.3.3 Proliferationsansatz MTT-Assay

Es erfolgt die Aufnahme des gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5-Diphenylterazoliumbromid) durch vitale Zellen. Mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen wird es zu einem stark blauen, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff umgewandelt. Für die photometrische Messung (570-590 nm) werden die Zellen lysiert, um den Farbstoff freizusetzen. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen. Der MTT-Test erfolgte in Doppelbestimmung.

Durchführung

- Auf die 12-Lochplatte in jedes Well (Anzahl nach Gebrauch) 1500 μ l Medium und 200 μ l INS-1 Zellen geben. Zellen bis 50 - 60% Konfluenz wachsen lassen;
- Medium absaugen, zu INS-1 Zellen jeweils 10 und 30 mM Glukoselösung geben, 3 Tage inkubieren. Es gab auch Versuche, wo die INS-1 Zellen mit den definierten Glukosekonzentrationen insgesamt 4 Tage inkubiert wurden mit Glukosemediumwechsel am 2. Tag. Dann wie folgt fortfahren:
- Zugabe von 20 μ l (5 mg/ml) MTT pro Well vorsichtig an die Wand (nicht schütteln);
- Inkubation für 1-3 Stunden im Brutschrank bei 37 °C;
- vorsichtiges Absaugen des Mediums und Lösen des Formazanfarbstoffs durch Zugabe von 200 μ l DMSO pro Well. 15 min auf dem Schüttler einwirken lassen;
- Mikrotiterplatte beschriften, in jedes Well 50 μ l H₂O und 50 μ l DMSO geben, die ersten 2 Wells freilassen, wegen Leerwertmessung;
- bei 570 nm photometrisch messen.

Reagenzien:

MTT (10 x) 5 mg/ml lösen in 1 ml PBS.

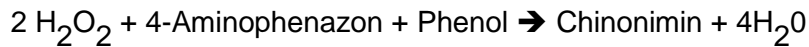
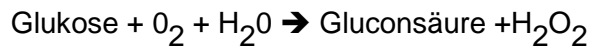
2.3.4 GOD-PAP Methode

(GOD= Glucoseoxidase, PAP = Phenol and Peroxidase)

Methode:

Bestimmung der Glukose nach enzymatischer Oxidation in Gegenwart von Glukose-oxidase. Indikator ist Chinonimin, das aus Wasserstoffperoxid und 4-Aminophenazon unter Anwesenheit von Phenol und Peroxidase gebildet wird.

Reaktionsprinzip:



Untersuchungsgut:

Glukosemedium der INS-1 Zellen in 2 verschiedenen Konzentrationen (10 und 30 mM)

Bestimmungsansatz:

Wellenlänge: 500 nm, Hg 546 nm

Schichtdicke: 1 cm

Temperatur: 20 – 25 °C

Messung: Gegen Reagenzienleerwert, für jede Messreihe genügt ein Reagenzienleerwert

Pipettierschema:

RGT: 1000 ml Enzymreagenz

Phosphat-Puffer (pH 7,5)	0,1 mol/l
4-Aminophenazon	0,25 mmol/l
Phenol	0,75 mmol/l
Glukoseoxidase	> 15 KU/l
Peroxidase	> 1,5 KU/l
Mutarotase	> 2,0 KU/l
Stabilisatoren	

STD: 3 ml Standard:

Glukose 100 mg/dl bzw. 5,55 mmol/l

- 1 Reagenzienleerwert → 2000 µl RGT in die Küvette pipettieren,
- Je Küvette 20 µl Probe und 2000 µl RGT pipettieren.

Mischen, 10 min bei 20 – 25 °C oder 5 min bei 37 °C inkubieren. Innerhalb von 60 min Extinktion des Standards und der Proben gegen den Reagenzienleerwert messen.

Berechnung der Glukose-Konzentration:

$$c = 100 \times \text{Probe/STD} = \{ \text{mg/dl} \} \quad \text{oder} \quad c = 5.55 \times \text{Probe/STD} = \{ \text{mmol/l} \}$$

Leitungsscharakteristik:

Linearität

Der Test ist bis zu einer Glukosekonzentration von 400 mg/dl oder 22,2 mmol/l linear.

Bei höheren Glukosekonzentrationen Proben mit Aqua dest. verdünnen.

2.3.5 Herstellung der Pioglitazonlösung

Pioglitazon wurde als Vorratslösung (10 mM) mit Dimethylsulfoxid (DMSO) vorbereitet und bis zum Gebrauch bei -20 °C eingefroren.

- 6,0 mg Pioglitazonpulver in 1682 µl DMSO lösen.

2.3.6 Isolation von RNA

Zur Isolation von RNA aus INS-1 Zellen wurden diese in je zwei Zellkulturschalen (ø 10-cm-Schalen) bis zu 80%iger Zelldichte angezogen. Die Isolation der RNA passierte per RNeasy Mini Kit nach den Angaben des Herstellers.

RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der RNA wurde mittels Photometrie festgelegt. Dafür sind folgende Schritte notwendig:

- 2 Eppendorfgefäße vorbereiten, mit TE (Leerwert) und Probe beschriften;
- in jedes Gefäß 500 µl TE pipettieren;
- in das Probegefäß 5 µl RNA-Probe pipettieren;

- Absorption bei 260 nm in der Quarzküvette
(1 OD = 40 µg RNA/ml).

Nachweis der präparierten RNA auf Agarosegel

Die Puffer wurden wie folgt hergestellt.

5 x TBE-Puffer pH = 8 (1 Liter)

- 54 g Tris-Base, 27,5 Borsäure, 7,44 g EDTA, nach dem Ansetzen autoklavieren

Auftragspuffer (1 ml)

- 20% Glycerin, 0,5 x TBE, Bromphenolblau

Durchführung:

- Agarosegelkammer mit 30%igem H₂O₂ säubern;
- 0,25 g Agarosefeststoff abwiegen;
- 5 ml 5 x TBE auf 50 ml Aqua dest. auffüllen, davon 25 ml zur Agarose geben und in der Mikrowelle aufkochen lassen;
- 2 µl Ethiumbromid in die aufgekochte Agaroselösung geben;
- Gelträger an den Seiten mit Gel abdichten, 1 min warten, den Rest der Gellösung in die Kammer geben und die Taschen einsetzen.

RNA-Vorbereitung

- 1 µg mit Ethanol gefällte RNA in ein Cup geben und 5 min auf höchster Stufe zentrifugieren;
- Ethanol abziehen;
- 6 µl RNAase-freies Wasser in den Cup mit RNA geben und gut durch pipettieren;
- 3 µl Auftragspuffer dazu pipettieren;
- Agarosegel in die Kammer einsetzen und mit ca. 150 ml Laufpuffer (5 x TBE) auffüllen;
- RNA in die Taschen pipettieren und bei 30 mA laufen lassen;
- nach 30 min Gel unter UV-Licht exponieren und davon ein Foto erstellen.

2.3.7 Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Nach der Herstellung der einzelsträngigen messenger RNA (mRNA) wurde mittels Reverse Transkription die mRNA in complementary DNA (cDNA) umgeschrieben.

Danach erfolgte die Amplifizierung von cDNA mittels PCR. Unter Anwendung des OneStep RT-PCR Kit wurde der Reaktionsansatz zur DNA-Synthese angesetzt. Die Proben und die Lösungen wurden auf Eis behandelt. Die verwendeten Volumina (s.u.) richteten sich nach den Angaben des Herstellers und hatten ein Endvolumen von 50µl. Die für die Synthese der HMGB1 cDNA verwendeten Primer und Polymerasen wurden folgendermaßen vorbereitet:

RNase freies Wasser: ad 50µl

5x Qiagen Onestep RT-PCR Puffer 10µl

dNTP Mix 2µl

Primer A (50 nmol/µl) 0,6µl

Primer B (50 nmol/µl) 0,6µl

Qiagen OneStep RT-PCR Enzym Mix 2µl

RNase-Inhibitor 0,2µl

(ggf. 5x Q-Solution) 10µl

Primer

Primer:

- HMG R1 → Sequenz 5'-3' : 5'-TTA TTC ATC ATC ATC AT-3'
- HMG R2 → Sequenz 5'-3' : 5'-TTC ATC ATC ATC ATC TT-3'
- HMG F → Sequenz 5'-3' : 5'-ATG GGC AAA GGA GAT CCT AA-3'

F = Forward, R1 und R2 = Reverse

Polymerasen: Expand high Fidelity, PfU (DNA-Polymerase)

1. Alle mit Expand

a) Actin + DMSO

b) HMG F + HMG R1/ +DMSO

c) HMG F + HMG R1/- DMSO

d) HMG F + HMG R2/+DMSO

e) HMG F + HMG R2/- DMSO

2. Alle mit PfU

f) Actin + DMSO

g) HMG F + HMG R1/ +DMSO

h) HMG F + HMG R1/- DMSO

i) HMG F + HMG R2/+DMSO

j) HMG F + HMG R2/- DMSO

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine hochsensitive Amplifikationsmethode, um wenige DNA-Abschnitte stark zu vermehren. Die PCR beruht auf einem einfachen Prinzip. Unter Anwendung von Ausgangs-DNA (Template DNA), spezifischen Primern und thermostabilen DNA-Polymerasen kommt es in einer bestimmten Zyklusabfolge zu einer Vervielfältigung der DNA.

Der Erfolg der PCR-Amplifikate wurde durch die Agarose-Gelelektrophorese überprüft und von den Bestandteilen Primer und Polymerasen getrennt. Zuvor wird das Agarosegel in Ethidiumbromid-Bad inkubiert, damit es am UV-Tisch sichtbar gemacht wird.

Anschließend wird die DNA aus der Gelbande mit einem Skalpell isoliert. Das Gel sollte dem UV-Licht nicht lange ausgesetzt werden. Die Kombination von Ethidiumbromid und UV-Licht wirkt sehr zerstörerisch auf die DNA, was eine minimale Klonierungseffizienz oder eine Mutation zur Folge haben kann. Zur Abschätzung der Molekülgröße werden Marker verwendet.

Die reverse Transkription und die Amplifikation in einem Thermocycler (Techne, Cambridge, UK) wird nach folgendem Programm durchgeführt:

Reverse Transkription: 30 min bei 50 °C

Initial PCR Aktivierungsschritt 15 min bei 95 °C

3-Schritt PCR:

- Denaturierung 0,5 min bei 94 °C
- Anlagerung 0,5 min bei 40 – 55 °C
- Elongation 1,0 min bei 72 °C

Anzahl der Zyklen 35

Final Extension 10 min bei 72 °C

Zur Überprüfung der PCR wurden 5-10µl PCR-Produkt mit Auftragspuffer versetzt und in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.3.8 Gelextraction und A-tailing

Nachdem die PCR-Produkte mit Hilfe eines Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt wurden, wurde das sog. A-tailing durchgeführt. Da die Pfu-Polymerase keinen Poly-A-Überhang im PCR-Produkt (= cDNA) bildet und somit nicht direkt in den Vektor kloniert werden kann, wird das A-tailing durchgeführt. Die notwendigen A-Überhänge am 3'-Ende des pcDNA3.1/V5-His-TOPO wurden mit Hilfe der Taq-Polymerase erstellt.

2.3.9 Topo Cloning Reaktion und Transformation

Die TOPO Cloning Technologie ermöglicht eine schnelle Ligation von PCR-Produkten in ein pcDNA3.1/V5-His-TOPO Vektor und anschließende Transformation von rekombinanten Vektoren in TOP10 Bakterien innerhalb eines Tages. Es wurde ein OneShot TOPO Cloning Kit verwendet. Die Untersuchung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung des TOPO-Kloning.

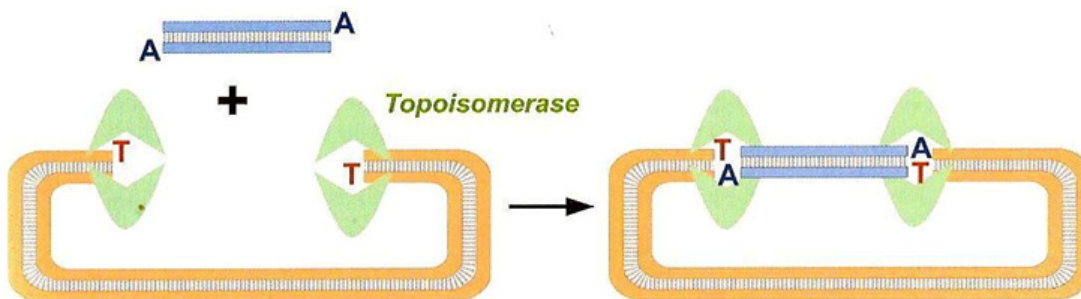


Abb. 3: Beim TOPO-Kloning verbindet eine an den Vektorenden vorhandene Topoisomerase I die Enden mit dem PCR-Amplifikat. Dabei besitzt der Vektor einen T-Überhang und das PCR-Amplifikat ein A-Tailing (Reinard T., Molekularbiologische Methoden 2010).

2.3.10 Plasmidpräparation aus E. coli

Die Bakterien werden in LB-Medium kultiviert. Nach dem Autoklavieren des Mediums lässt man die Flüssigkeit abkühlen und fügt das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin 100 mg/ml) hinzu. Das Antibiotikum selektiert die transformierten E. coli-Klone. Durch ein Antibiotikum-Resistenzgen auf den eingeführten Plasmiden sind die plasmid-positiven Kolo-

nien vor dem Antibiotikum geschützt, die anderen sterben ab. Für das Kultivieren auf Platten wird dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar zugefügt. Nach dem Abkühlen auf 50 °C wird die entsprechende Menge Ampicillin zugegeben und die Platten werden gegossen. Auf den Platten werden Bakterien über Nacht bei 37 °C kultiviert. Bei Bedarf kann die Platte bei 4 °C mehrere Wochen gelagert werden. Flüssigkulturen werden mit einer Kolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler angezüchtet. Die Kolonien werden erst in einer kleinen Menge (5 ml) kultiviert und anschließend in größere Mediummengen (120 ml) überführt.

Plasmidpräparation

Um die erhaltenen Bakterienkolonien auf positive Klone hin zu untersuchen, wurden einzelne Kolonien von den oben definierten LB_{amp}-Platten mit einer autoklavierten Pipettenspitze gepickt und mit 10 ml LB_{amp}-Medium (Ampicillin, Stocklösung: 100 mg/ml) angeimpft. Die Zellen werden über Nacht bei 37 °C zur Vermehrung auf einen Schüttler gelegt und damit zur Amplifikation der Plasmide inkubiert. Im Anschluss wurde zur Aufreinigung des Plasmids der NucleoBond Plasmid Purification Kit (Mini) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

2.3.11 Restriktionsenzymverdau

Die aus dem Mini-Präp gewonnenen Plasmide wurden mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten und mit dem Agarosegel auf Klone mit dem richtig orientierten Insert untersucht. Mit den positiven Klonen wurde dann nach Herstellerangaben ein Maxi-Präp durchgeführt. Das Plasmid mit den richtigen Schnittstellen wurde erneut mit Restriktionsenzymen linearisiert, gesäubert und sequenziert, bevor diese in der Transfektion eingesetzt wurden.

Restriktionsendonukleasen spalten die DNA an einer spezifischen Sequenz von 4 - 8 Basen, die sehr häufig palindromisch sind. Sie können zur Überprüfung der Lagestellung von Insert und Plasmiden benutzt werden.

2.3.12 Stabile Transfektion (GenePORTER Transfection)

Der GenePORTER Transfection Reagent eignet sich für eine stabile Transfektion. Zur Selektion der transfizierten Zellen wurde Antibiotikum ins Kulturmedium gegeben, da sie das Resistenzgen enthielten.

Bestehend aus:

getrocknetem GenePORTER-Lipidfilm, 0,8 ml Hydrierungspuffer, 2 x 2 ml DNA-Verdünnungspuffer, 1 x 4 ml DNA-Verdünnungspuffer B, Lagerung bei 4 °C.

Vor Gebrauch GenePORTER-Lipidfilm mit 0,8 ml Hydrierungspuffer bei Raumtemperatur hydratisieren und für 10 sec stark vortexen. Für anhaftende Zellen benötigt man 5 µl GenePORTER-Reagenz zu 1 µg DNA Transfektion von anhaftenden Zellen.

Vor der Transfektion sollte man die Zellen so teilen, dass sie am Tage der Transfektion zu 60 - 90% konfluent gewachsen sind.

- DNA mit serumfreien Medium verdünnen und die Hälfte des Transfektionvolumens (empfohlen 2 ml) nehmen;
- GenePorter Reagenz mit serumfreiem Medium verdünnen und die andere Hälfte des Transfektionvolumens nehmen;
- verdünnte DNA mit dem verdünnten GenePORTER Reagenz schnell zusammenmischen und bei Raumtemperatur für 10 - 45 min inkubieren;
- Kulturmedium von den Zellen absaugen, vorsichtig die DNA-GenePORTER-Mischung auf die Zellen geben und bei 37 °C für 3 - 5 Stunden inkubieren;
- 3 - 5 Stunden nach der Transfektion das Medium mit 20% FCS auf die Zellen geben und über Nacht bei 5 - 10% CO₂ bei 37 °C inkubieren;
- 24 Stunden nach der Transfektion frisches Medium und Gentamycin hinzufügen;
 - Isolierung stabil geklonter INS-Zellen unter Einwirkung von Gentamycin.

3 Ergebnisse

Die Arbeit begann mit der Untersuchung von β -Inselzellen unter den definierten Glukosekonzentrationen (10 und 30 mM). Die herunter regulierten Proteine HMGB1 und Caspase 3 wurden mit Pioglitazon behandelt. Ferner wurde eine stabile Transfektion durchgeführt. HMGB1 und Caspase 3 waren Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit.

3.1 Einfluss erhöhter Glukosekonzentration auf die INS-1 Zellen

Als erster Schritt wurden INS-1 Zellen unter zwei verschiedenen Glukosekonzentrationen kultiviert. Die eine Konzentration entspricht einem Wert von 10 mM Glukose, um das Einfache eines gesunden Menschen erhöht, und die andere einem Wert von 30 mM Glukose, was einen pathologischen Wert darstellt, welcher bei an Diabetes mellitus erkrankten Personen zu messen ist. Die Glukosemedien wurden ohne Serum vorbereitet, da dieses das Wachstum der Zellen positiv beeinflusst hätte.

Die Zellen wurden vier Tage lang im Brutschrank bei 37 °C gehalten. Am zweiten Tag wurden die Glukosemedien ausgewechselt, um eine konstante Glukosekonzentration zu gewährleisten. Am vierten Tag wurde aus den behandelten INS-1 Zellen eine Proteinextraktion und -bestimmung durchgeführt. Mittels 2D-Gelelektrophorese erfolgte eine Trennung der Proteine. Nach der Silberfärbung wurden viele Proteine reguliert vorgefunden (Abb. 4).

INS-1 10mM Glukosekonzentration



INS-1 30mM Glukosekonzentration

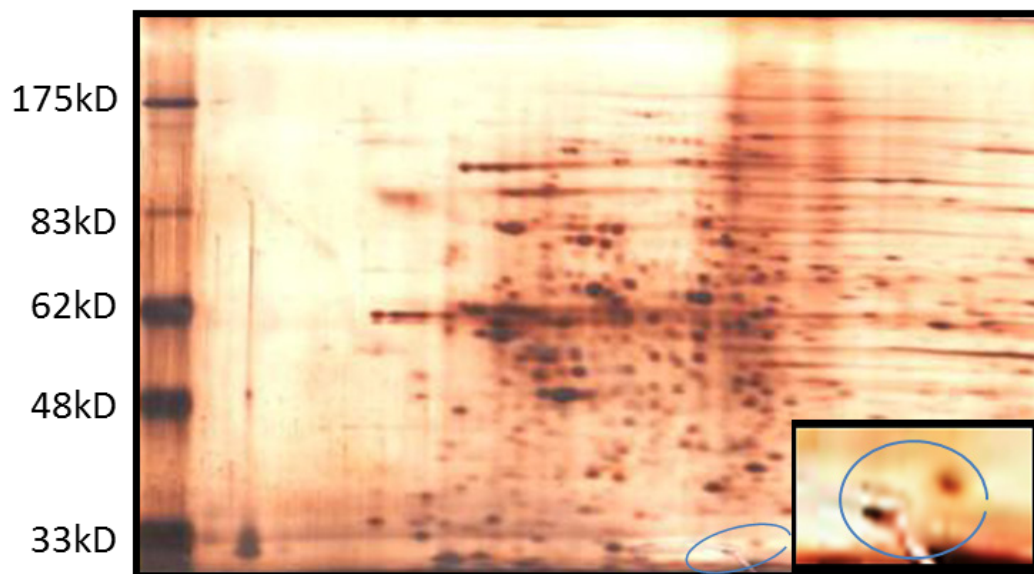


Abb. 4: Herunterregulation von zwei Proteinspots im Bereich von 33 kDa unter 30 mM Glukosebedingungen im Vergleich zu 10 mM. Hier handelt es sich um eine Silberfärbung.

Die isoelektrische Trennung in der ersten Dimension erfolgte mit Trägerampholyten im Bereich von pH (3-10 und 4-7) und in der zweiten Dimension auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel. Es ist eine eindeutige Herunterregulation von zwei Spots (Pfeile) im Bereich von 33 kDa unter den mit 30 mM Glukose (B) behandelten INS-1 Zellen zu identifizieren im Vergleich zu den mit 10 mM (A) behandelten INS-1 Zellen. Diese Angaben wurden 25 Mal reproduziert und die Werte +/- Standardabweichungen gezeigt. Im nächsten Schritt wurden einige regulierte Spots, nachdem ein präparatives Gel (Abb. 5 A und B) gefahren worden war, aus dem Gel ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie weiter untersucht.

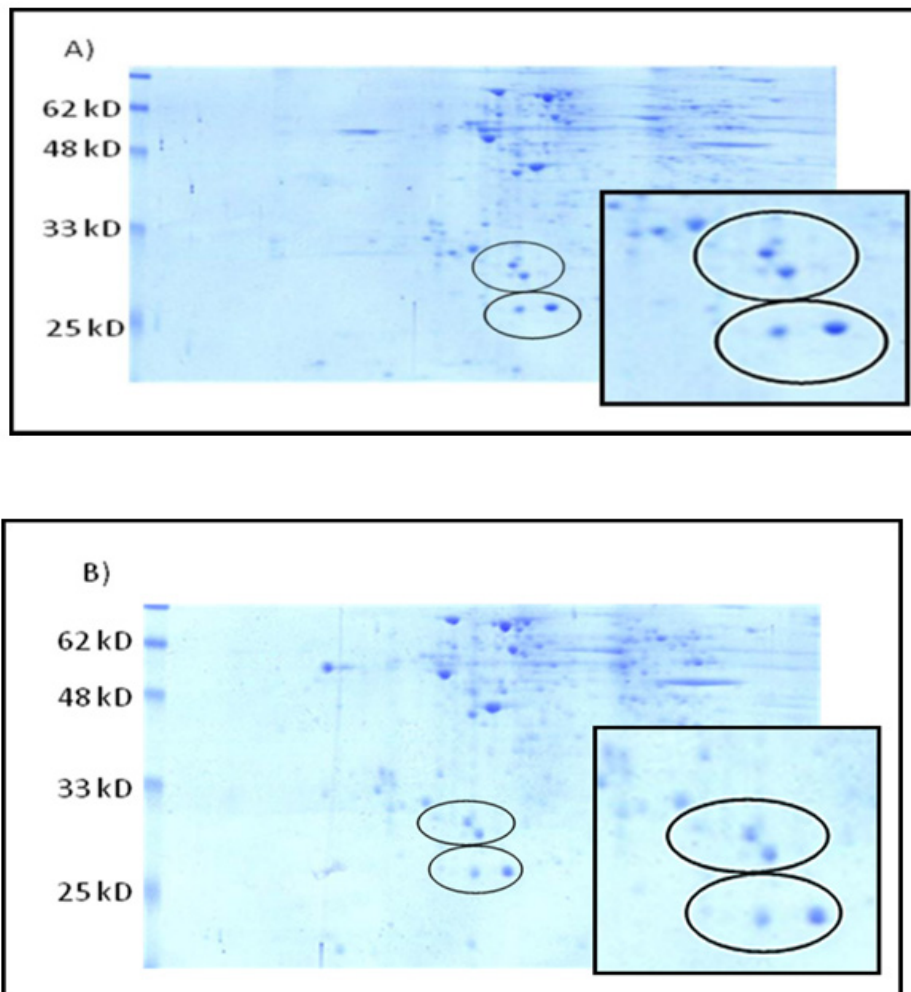


Abb. 5: Inkubation der INS-1 Zellen mit den Glukosekonzentrationen 10 mM (A) und 30 mM (B). Hier handelt es sich um eine Coomassie-Blue-Färbung.

Als Beispiele deuten die Einkreisungen auf einen Unterschied im Proteinmuster bezogen auf unterschiedliche Glukosekonzentrationen. Diese Angaben wurden 3 Mal reproduziert und die Werte +/- Standardabweichungen gezeigt.

Folgende Proteine wurden als reguliert identifiziert:

(↑, hochreguliert; ↓, herunterreguliert):

10%iges Gel:

- ATPsynthase α chain (55 kD) ↑
- Dipeptidylpeptidase (80 kD) ↓
- HSPC 263 (38 kD) ↓
- HMGB 1 (33 kD) ↓
- Caspase 3 (33 kD) ↑

15%iges Gel:

- Chromatin structural protein (16 kD) ↓
- Rho dissociation inhibitor (GDI) α (30 kD) ↓
- Superoxiddismutase 1 (17 kD) ↓
- Cellular retinoic acid binding protein (12 kD) ↑

Einige regulierte Spots konnten nach massenspektrometrischer Analyse keinen bekannten Proteinen zugeordnet werden. Es könnte sich hierbei um bisher unbekannte Proteine handeln, die in der Datenbank nicht aufgeführt sind.

Von großem Interesse waren für uns die Proteine HMGB1 und Caspase 3. Über das HMGB1 gibt es aktuell wenige Erkenntnisse. Hierbei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der auch an bestimmte Transkriptionsfaktoren bindet (Thomas und Stott 2012). Er spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung zahlreicher klinischer Erkrankungen sowie bei Diabetes mellitus (Volz et al. 2010), der Autoimmunität, kardiovaskulären Erkrankungen und in der Tumorgenese (Sun et al. 2013). Caspase 3 spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Apoptose, indem es mit verschiedenen Faktoren interagiert. In Anbetracht dieser Information sollen in dieser Studie Erkenntnisse über die zellulären Folgen der Hyperglykämie gewonnen werden.

3.1.1 Einfluss von Glukose auf die Vitalität der INS-1 Zellen

Die INS-1 Zellen wurden mit Glukosekonzentrationen von 10 mM, 30 mM und normalem Medium (nm) über einen Zeitraum von 96 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Glukosemedien wurden ohne Serum vorbereitet. Als Vergleich wurden auch die INS-1 Zellen unter denselben Bedingungen mit normalem Nährmedium behandelt, welches Serum enthielt. Nach 48 Stunden wurde das Medium ausgetauscht, um die Glukosekonzentration konstant zu halten. Parallel wurde derselbe Versuch nochmals durchgeführt, wobei diesmal das Glukosemedium nicht gewechselt wurde. Durch eine Doppelbestimmung per MTT-Assay wurde die Zellproliferation identifiziert. Nach Exposition der INS-1 unter definierten Glukosekonzentrationen zeigten sich nach 96 Stunden Wirkungen auf das Zellwachstum.

Versuch ohne Mediumwechsel:

Bei der Datenerhebung wurde die Vitalität unter 10 mM Glukosebedingungen gleich $100\% \pm 3\%$ gesetzt. Bei INS-1 Zellen ohne Mediumwechsel beobachtete man nur einen geringen Vitalitätsunterschied. Die INS-1 Zellen waren unter 30 mM Glukose in ihrem Zellwachstum im Vergleich zur 10 mM um ca. 17% eingeschränkt ($83\% \pm 2\%$). INS-1 Zellen in normalem Nährmedium zeigen ein besseres Zellwachstum um ca. 119%. Das in normalem Medium enthaltene Serum stellt für die Zellproliferation optimale Voraussetzungen dar (Abb. 6).

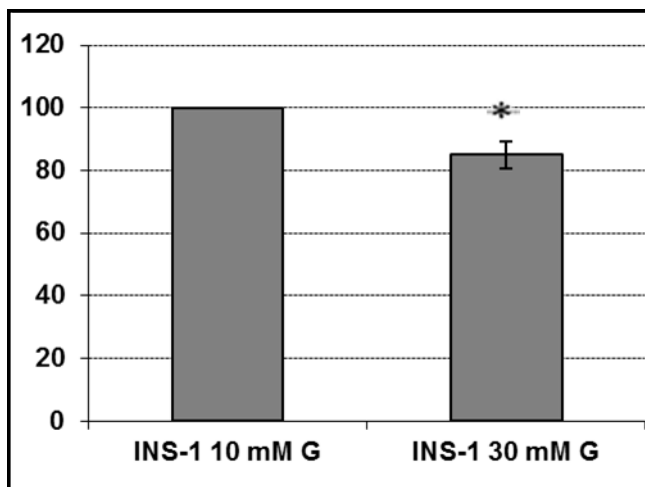


Abb. 6: INS-1 Zellen unter 10 mM und 30 mM Glukose (G) und ohne Mediumwechsel. Angaben sind Mittelwerte \pm S.E.M. (n=22) in Prozent [%] von Kontrolle (10 mM G).

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, t-Test.

Versuch mit Mediumwechsel:

Bei dem Versuch mit einem Glukosemediumwechsel zeigten sich deutlichere Unterschiede. Es ist eine signifikante Abnahme der Proliferation der INS-1 Zellen im Medium mit 30 mM Glukose zu beobachten im Vergleich zu Medium mit 10 mM Glukose (Abb. 7).

Fazit: Unter dauerhaft erhöhten Glukosebedingungen zeigen die INS-1 Zellen eine eingeschränkte Zellproliferation.

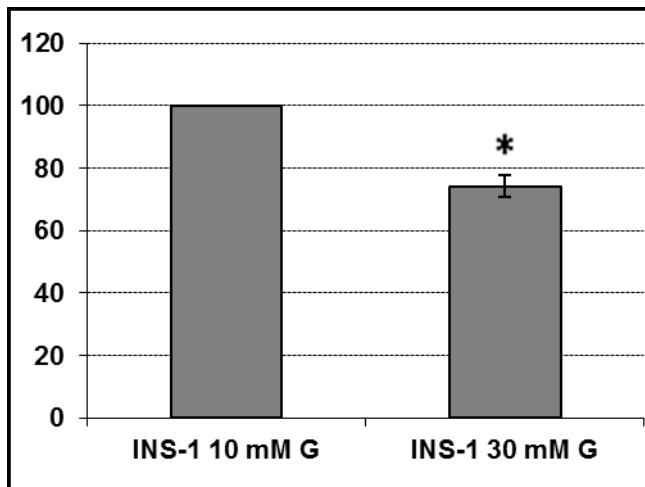


Abb. 7: INS-1 Zellen unter 10 mM und 30 mM Glukose (G) und mit Mediumwechsel. Angaben sind Mittelwerte \pm S.E.M. (n=30) in Prozent [%] von Kontrolle (10 mM G).

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, t-Test.

3.1.2 Immunchemischer Nachweis von HMGB1 und Caspase 3 in INS-1 Zellen

Die INS-1 Zellen wurden in 10 und 30 mM serumfreiem Glukosemedium in 96 Stunden bei 37 °C angezüchtet. Nach 48 Stunden erfolgte ein Glukosemediumwechsel. HMGB1 und Caspase 3 wurden mittels Westernblot detektiert. Die immunreaktiven Banden lagen beim erwarteten Molekulargewicht: HMGB1 bei 31 kD und Caspase 3 bei 17, 19 und 33 kDa (Abb. 9). HMGB1 wurde bei 30 mM Glukose im Vergleich zu 10 mM Glukose herunterreguliert vorgefunden (Abb. 8). Simultan zeigte sich eine Aktivierung von Caspase 3 (Abb. 9).

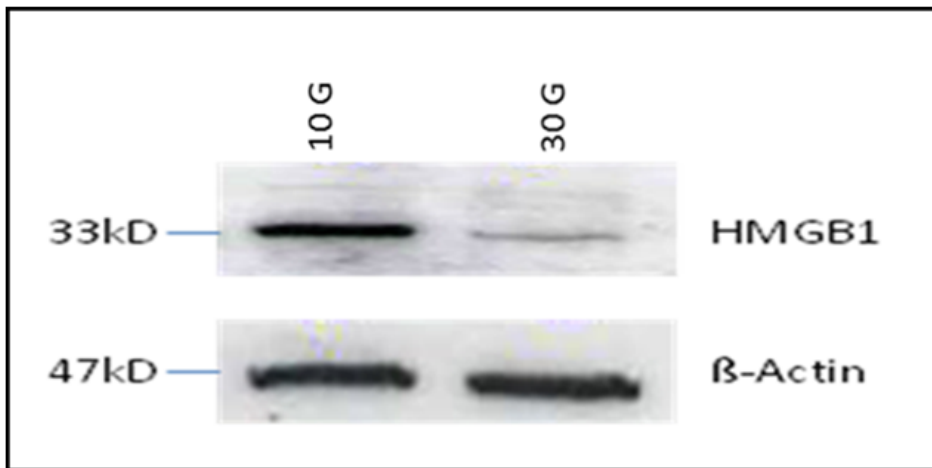


Abb. 8: Herunterregulation von HMGB1 bei 30 mM Glukose im Vergleich zu 10 mM. Die Banden für β -Actin zeigen eine gleichmäßige Proteinauftragung. 10G: 10 mM Glukose, 30G: 30 mM Glukose). Gezeigt werden repräsentative Bilder von 5 Versuchen.

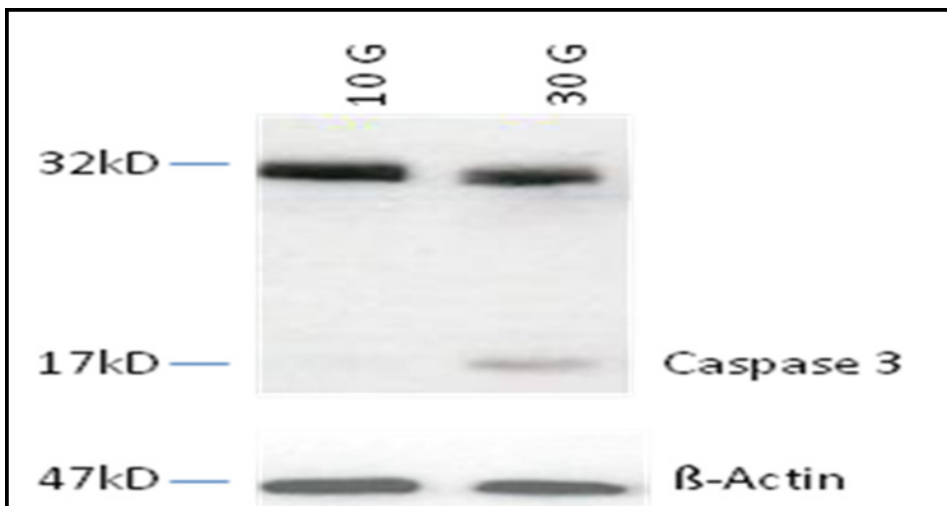


Abb. 9: Zerlegung von Caspase 3 in seine Fragmente unter 30 mM Glukosebedingungen. β -Actin und Ponceau S zeigen eine gleichmäßige Proteinauftragung (10G: 10 mM Glukose, 30G: 30 mM Glukose). Gezeigt werden repräsentative Bilder von 8 Versuchen.

3.1.3 SOD und ATPase im Westernblot

Die INS-1 Zellen wurden bei 10 mM und 30 mM Glukosekonzentrationen über einen Zeitraum von 96 Stunden inkubiert. Nach 48 Stunden fand ein Mediumwechsel statt, um eine gleichmäßige Glukosebelastung zu gewährleisten. Die Daten der 2D-Gelanalyse, bezogen auf ATPase (55 kD) und SOD (17 kD), konnten nicht verifiziert werden.

3.1.4 Nachweis von HMGB1 im Mediumüberstand

Die INS-1 Zellen wurden wie in den vorherigen Versuchen behandelt. Nach 96 Stunden erfolgte eine Zentrifugation der Zellen. Aus dem Mediumüberstand wurde dann HMGB1 mittels Western nachgewiesen. Es stellten sich sehr schwache Banden dar, zu schwach für Regulationen mit Westernblot, um eine Aussage machen zu können. Unter denselben Bedingungen wurden auch an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit dem Mediumüberstand einige Westernblots durchgeführt. Dabei war HMGB1 im Mediumüberstand nicht detektierbar. Auch nach einer Acetonfällung des Mediumüberstandes konnte HMGB1 unter den definierten Glukosekonzentrationen nur sehr schwach dargestellt werden und war somit nicht verwertbar.

3.1.5 Zellfraktionierung

Die INS-1 Zellen wurden mit den definierten Glukosekonzentrationen insgesamt vier Tage lang inkubiert, wobei nach 48 Stunden ein Glukosemediumwechsel stattfand. Jeden Tag wurden die Aliquots der Zellen in die Bestandteile Kern und Zytosol zerlegt. Nach einer Proteinbestimmung wurde aus den jeweiligen Zellfraktionen ein Westernblot zur Detektion von HMGB1 durchgeführt (Abb. 10).

Fazit:

- | | |
|----------------|---|
| 1. und 2. Tag: | keine Regulation ersichtlich unter den definierten Glukoselösungen (nicht gezeigt). |
| 3. Tag: | Unter 30 mM Glukose weniger HMGB1 im Kern und Zytosol. |
| 4. Tag: | Deutliche Reduktion von HMGB1 im Kern und Zytosol. |

Unter der Hyperglykämie sind sowohl im Kern als auch im Zytosol HMGB1 vorhanden. Es findet keine Translokation statt.

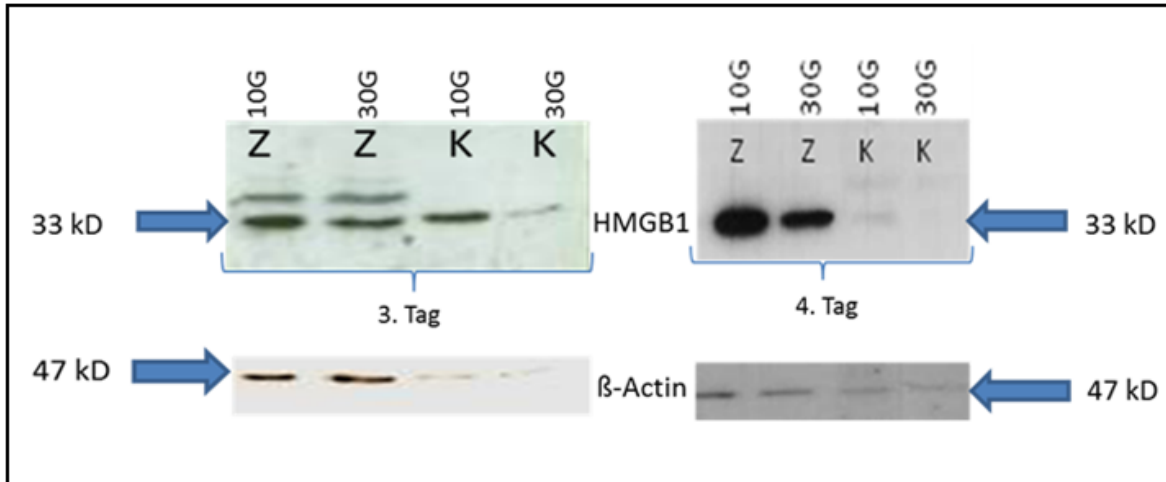


Abb. 10: HMGB1 ist ab dem 3. Tag in der Zytosolfraction unter erhöhten Glukosebedingungen herunterreguliert. Am 4. Tag zeigt sich eine signifikante Abnahme. 10G: 10 mM Glukose, 30G: 30 mM Glukose, K: Zellkern, Z: Zytosol. Gezeigt werden repräsentative Bilder von 6 Versuchen.

3.1.6 Regulation von HMGB1 unter Pioglitazonbehandlung

INS-1 Zellen wurden mit Pioglitazon für 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurden den Zellen wie gewohnt die definierten Glukosekonzentrationen gegeben mit Zusatz von Pioglitazon. Unter denselben Voraussetzungen lief eine Kontrolle mit DMSO und den Glukoselösungen. Die vorinkubierten Zellen wurden dann nochmals in unterschiedlichen Zeiten (24, 48, 72 und 96 Stunden) inkubiert, geerntet und für den Westernblot vorbereitet. Pioglitazon zeigte in den INS-1 Zellen, die einer 30 mM Glukosekonzentration ausgesetzt waren, die Wiederherstellung der HMGB1-Expression nach 48 Stunden (Abb. 11a). Dieser Effekt ist unter nur erhöhter Glukosekonzentration ohne Pioglitazon nicht zu beobachten. Nach 24 Stunden war kein signifikanter Unterschied der HMGB1-Expression in den definierten Glukosekonzentrationen sowie mit oder ohne Zusatz von Pioglitazon zu verfolgen.

Bei 30 mM Glukose ohne Pioglitazonbehandlung war eine Abnahme der HMGB1-Expression unter 48 und 72 Stunden zu beobachten (Abb. 11 a, b). In Anwesenheit von Pioglitazon und gleichzeitig erhöhten Glukosekonzentrationen konnte eine Reduktion der

HMGB1-Expression aufgehoben werden (Abb. 11 b, c Nach 72 Stunden zeigt sich eine Herunterregulation von HBMG1 unter Pioglitazon mit 10 mM Glukose. Pioglitazon inhibiert die HMGB1-Expression. Dieser Teil der Arbeit wurde 2007 in Journal of Bioscience veröffentlicht.

Nach einer Inkubation von 96 Stunden der INS-1 Zellen beobachtete man bei 10 mM Glukose mit Pioglitazon und 30 mM Glukose eine deutliche Abnahme von HMGB1 im Vergleich zu 10 mM Glukose ohne Pioglitazon und zu 30 mM Glukose mit Pioglitazon (Abb. 11c).

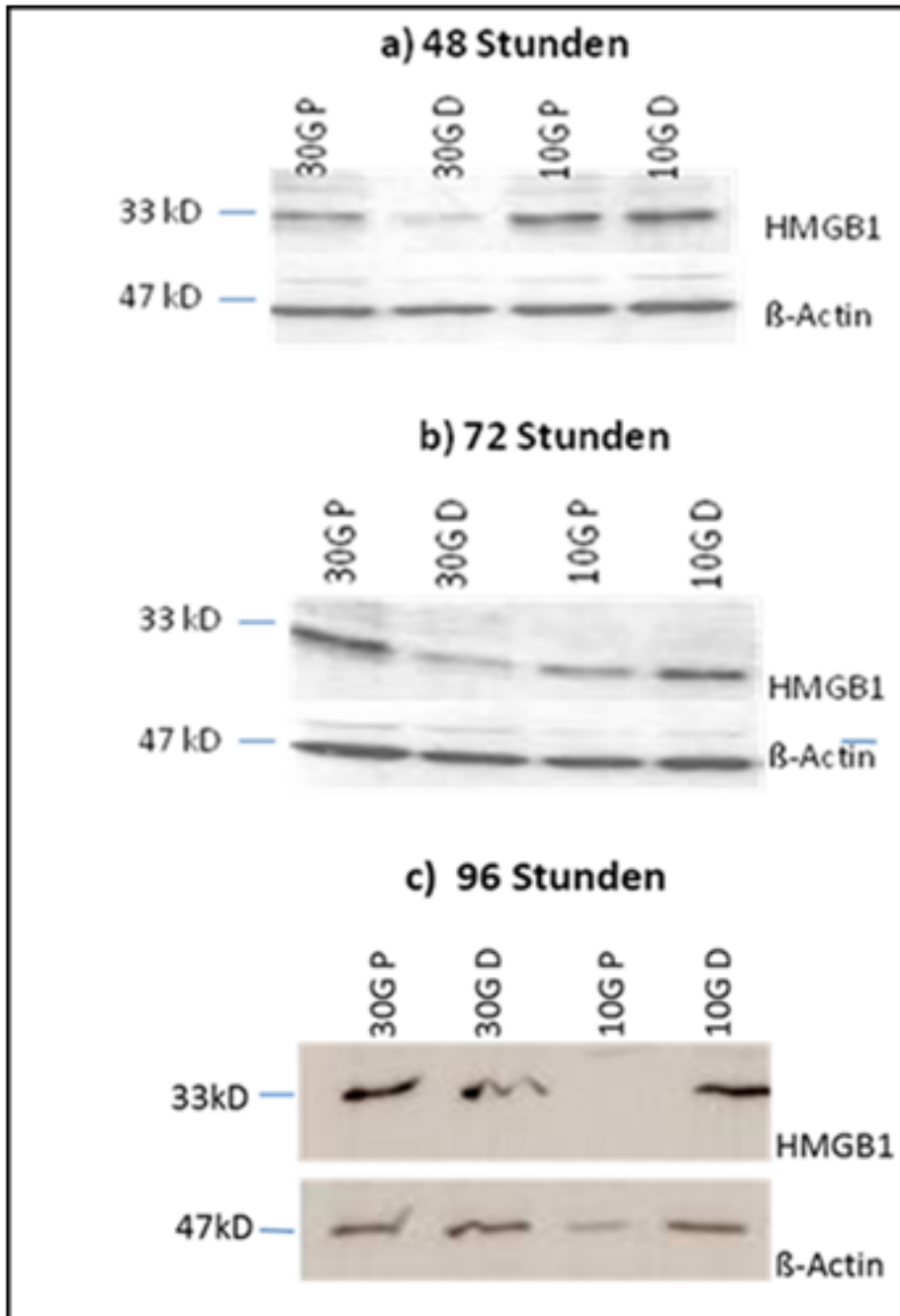


Abb. 11 a, b, c: Effekt von Glukose und Pioglitazon auf die Proteinexpression von HMGB1 in den INS-1 Zellen. β -Actin zeigt eine gleichmäßige Proteinauftragung. a) Inkubation 48 Stunden, b) Inkubation 72 Stunden und c) Inkubation nach 96 Stunden. 10G: 10 mM Glukose, 30G: 30 mM Glukose, P: Pioglitazon, D: DMSO (Kontrolle). Gezeigt werden repräsentative Bilder von 38 Versuchen.

3.1.6.1 Aktivierung von Caspase 3 unter Pioglitazonbehandlung

Bei 30 mM Glukose zeigte sich eine Aktivierung von Caspase 3. Unter der Einwirkung von Pioglitazon bei erhöhten Glukosekonzentrationen wird die Spaltung von Caspase 3 aufgehoben. Unter 10 mM Glukose hat Pioglitazon keine Wirkung auf Caspase 3 (Abb. 12).

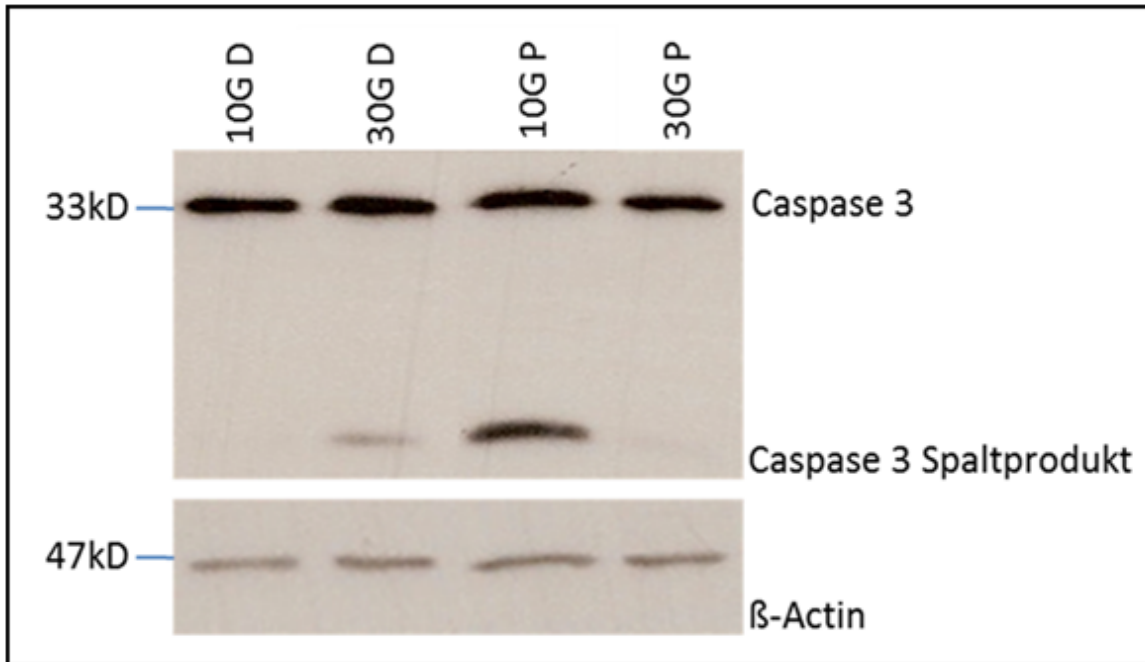


Abb. 12: Aktivierung von Caspase 3 bei 30 mM Glukose ohne Pioglitazon und bei 10 mM Glukose mit Pioglitazon nach 72 Stunden. β -Actin zeigt eine gleichmäßige Proteinauftragung. 10G: 10 mM Glukose, 30G: 30 mM Glukose, P: Pioglitazon, D: DMSO (Kontrolle). Gezeigt werden repräsentative Bilder von 20 Versuchen.

3.1.6.2 Regulation von Bcl2 unter Pioglitazonbehandlung

Unter denselben Bedingungen wurde auch das Protein Bcl2 (28 kDa) aufgrund seiner antiapoptotischen Wirkung untersucht (Abb. 13). Am 1. und 2. Tag zeigte sich unter den definierten Glukosekonzentrationen mit oder ohne Pioglitazon keine Regulation. Am 3. Tag war eine Hochregulation bei 10 mM Glukose mit Pioglitazon im Vergleich zu 30 mM Glukose mit Pioglitazon vorhanden. Bei 10 und 30 mM Glukose mit DMSO war keine Regulation von Bcl2 sichtbar. Unter denselben Versuchsbedingungen wurden die Proteine Bclx, Survivin (16 kDa) und Cyclin D1 (36 kD) untersucht, aber es war keine signifikante Regulation mit oder ohne Pioglitazon vom 1. - 3. Tag festzustellen.

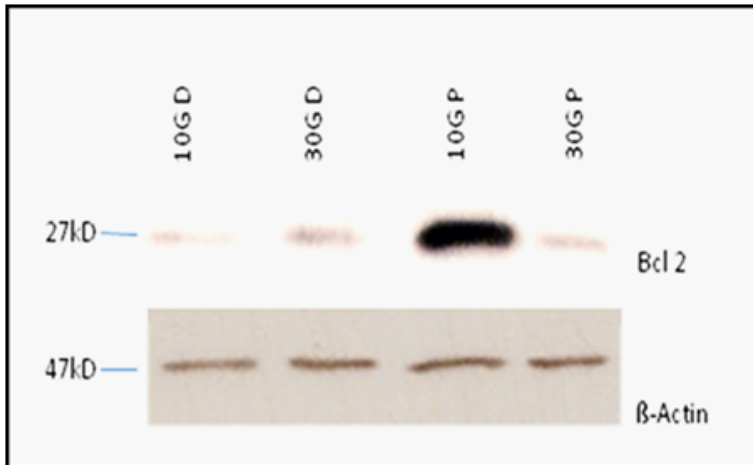


Abb. 13: Hochregulation von Bcl 2 bei 10 mM Glukoselösung mit Pioglitazon. β -Actin zeigt eine gleichmäßige Proteinauftragung. 10G: 10 mM Glukose, 30G: 30 mM Glukose, P: Pioglitazon, D: DMSO (Kontrolle). Gezeigt werden repräsentative Bilder von 5 Versuchen.

3.1.7 Einfluss von Pioglitazon auf die Vitalität der INS-1 Zellen unter Glukosebelastung

Unter Pioglitazonbehandlung war die Zellproliferation, besonders bei 10 mM Glukose, deutlich eingeschränkt (4%). Es zeigte sich eine toxische Wirkung auf das Überleben der Zellen. Teilweise waren alle INS-1 Zellen unter der Behandlung verstorben. Bei einer Konzentration von 30 mM Glukose zeigten die mit Pioglitazon behandelten Zellen eine bessere Vitalität (41%). Im Vergleich zu der Kontrolle war mit Pioglitazon die Vitalität der Zellen vermindert. Bei der Kontrolle zeigte sich, dass die INS-1 Zellen bei 30 mM Glukose eine signifikante Reduktion der Überlebensrate zeigten. Eine zusätzliche Behandlung der INS-1 Zellen mit Pioglitazon unter hyperglykämischen Bedingungen zeigte keine Wirkung auf das Überleben (Abb. 14). Die INS-1 Zellen wurden über einen Zeitraum von 96 Stunden unter 10 und 30 mM Glukose in Anwesenheit von Pioglitazon oder DMSO inkubiert. Nach 48 Stunden wurde das Medium ausgewechselt. Die metabolische Aktivität der INS-1 Zellen wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Bei der Auswertung wurde die Inkubation bei 10 mM Glukose mit DMSO gleich 100% gesetzt.

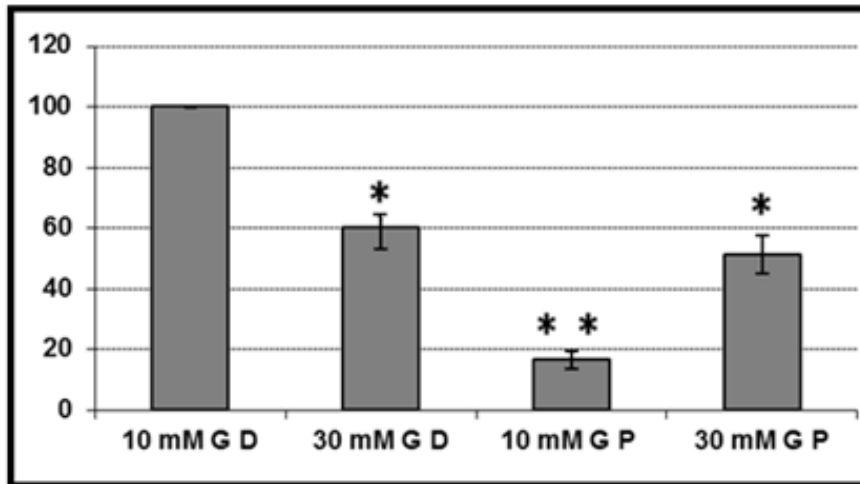


Abb. 14: Überleben der INS-1 Zellen unter Glukose (10 mM, 30 mM) mit und ohne Pioglitazon. G, Glukose; D, DMSO; P, Pioglitazon. Angaben sind Mittelwerte \pm S.E.M. (n=27) in Prozent [%] von Kontrolle (10 mM G D). * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle, ANOVA und post-hoc LSD-Test.

3.1.8 Nachweis der konstanten Glukosekonzentration

INS-1 Zellen wurden 4 Tage lang mit 10 mM und 30 mM Glukose inkubiert, ein Versuch mit Pioglitazon und mit DMSO als Kontrolle. Ein Mediumwechsel fand nicht statt. Täglich wurden von den verschiedenen Inkubationsbedingungen die Glukosekonzentrationen mittels enzymatischer Oxidation bestimmt. Zwischen den Versuchen mit Pioglitazon und der Kontrolle mit DMSO wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Die Glukosekonzentration blieb über die Untersuchungstage unverändert konstant, so dass sie weder durch die INS-1 Zellen noch durch Pioglitazoneinwirkung verstoffwechselt wurde (Abb. 15).

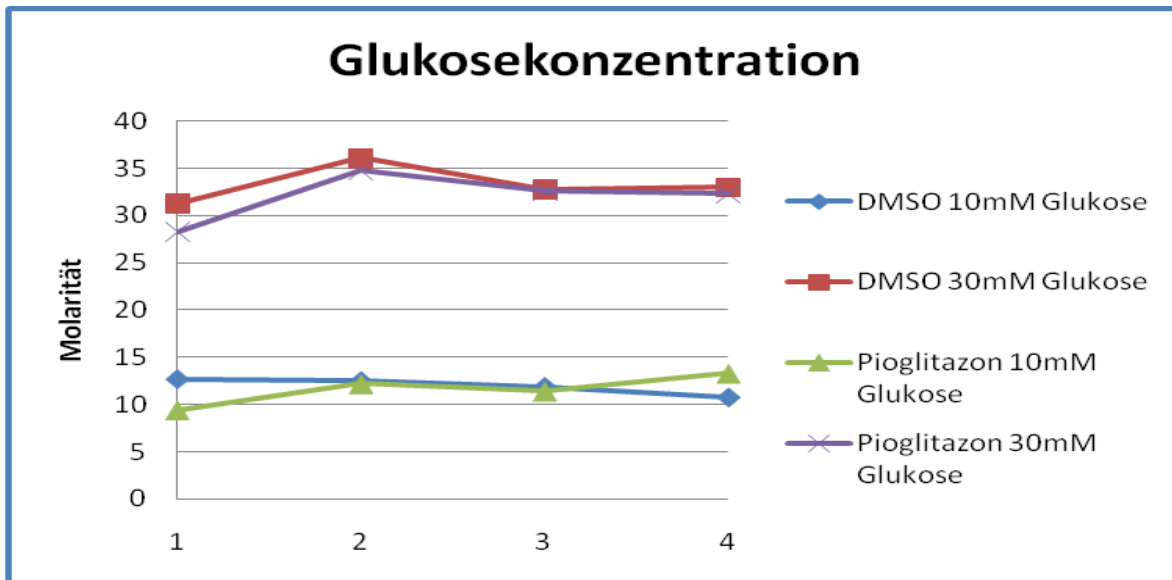


Abb. 15: Keine Beeinflussung der Glukosekonzentration durch Pioglitazon innerhalb des Zeitraums. Diese Angaben wurden 4 Mal reproduziert und die Werte +/- Standardabweichungen gezeigt.

3.1.9 Stabile Überexpression von HMGB1

Es wurde eine stabile Überexpression von HMGB1 in INS-1 Zellen durchgeführt, um die Effekte von HMGB1 zu untersuchen.

Nach RNA-Isolation wurde die RNA auf Intaktheit überprüft. Die isolierte Gesamt-RNA besteht aus ungefähr 80% ribosomaler RNA (rRNA). Daher ergeben sich in einem RNA-Agarosegel immer zwei Banden. Bei Eukaryonten entsprechen diese der 18 S und 28 S (S = Svedberg) rRNA (1,8 und 4,7 kbp) (Abb. 16).

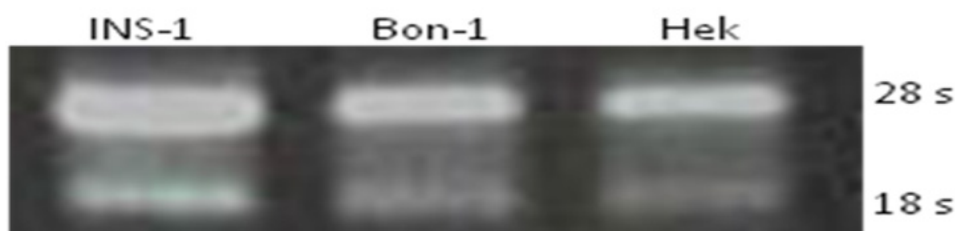


Abb. 16: Nachweis intakter RNA im Gel bei deutlich getrennten Banden, die 28 S und 18 S Bande ribosomaler RNA darstellen. Bon-1- und Hek 293-Zellen entsprechen Kontroll-RNA aus anderen Zelllinien. Gezeigt werden repräsentative Bilder von 2 Versuchen.

Mittels RT-PCR und spezifischen Primern wurde dann die mRNA in die cDNA von HMGB1 (645 bp) umgeschrieben (Genbank: NM 002128).

Die RT-PCR ist eine Kombination von zwei verschiedenen Reaktionen, die nacheinander im gleichen Reaktionsgefäß durchgeführt wurden. Das zentrale Enzym für den ersten Teil der Reaktion ist die Reverse Transkriptase, welche die einzelsträngige mRNA in cDNA (complementary DNA) umschreibt. Die cDNA von HMGB1 wird im zweiten Teil der Methode mittels PCR amplifiziert. Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde nachgewiesen, dass die PCR mit der PfU-Polymerase stattgefunden hat. Die PfU-Polymerase ist eine thermostabile DNA-Polymerase, die zusätzlich eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität aufweist. Daher ist sie in der Lage, eine Korrektur durchzuführen, falls ein falsches Nukleotid eingebaut wird. Bei den „Proofreading“-Polymerasen ist außerdem bekannt, dass sie kein A-tailing durchführen. Neben einer hohen Synthesegeschwindigkeit und Genauigkeit können sie auch sehr lange Amplifikate produzieren.

Die DNA-Amplifikation mit der Expand-Polymerase hat nicht stattgefunden (b-e). Diese konnte mit der PfU-Polymerase durchgeführt werden (g-j), die ein Fragment mit dem erwarteten Basenpaar gab. Das korrekte DNA-Fragment wurde ausgeschnitten und extrahiert. Die Amplifikate a und f (Actin, 600 bp) dienen als Positivkontrolle (Abb. 17).

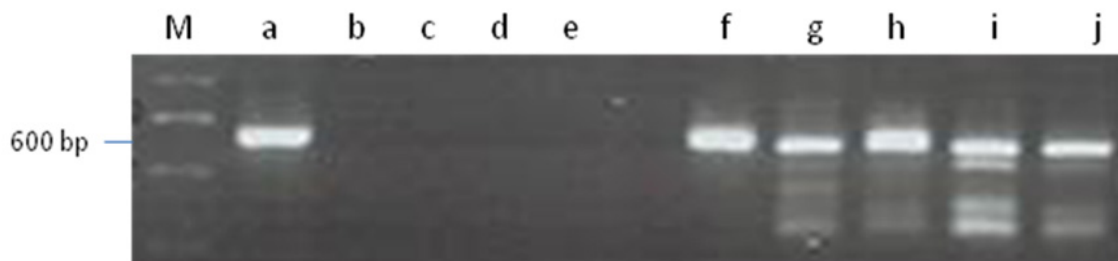


Abb. 17: Überprüfung der PCR-Amplifikate. M = Marker. Gezeigt werden repräsentative Bilder von 2 Versuchen.

Nach der Vervielfältigung eines DNA-Fragments erfolgte nach einer Abfolge von enzymatischen Reaktionen die TOPO-Klonierung. Beim TOPO-Cloning verbindet die Topoisomerase I (T-Überhang) die Enden mit dem PCR-Amplifikat (A-Tailing). Das entstandene Konstrukt wurde dann zur Vermehrung in kompetente E.Coli-Bakterien eingebracht (Abb. 18).

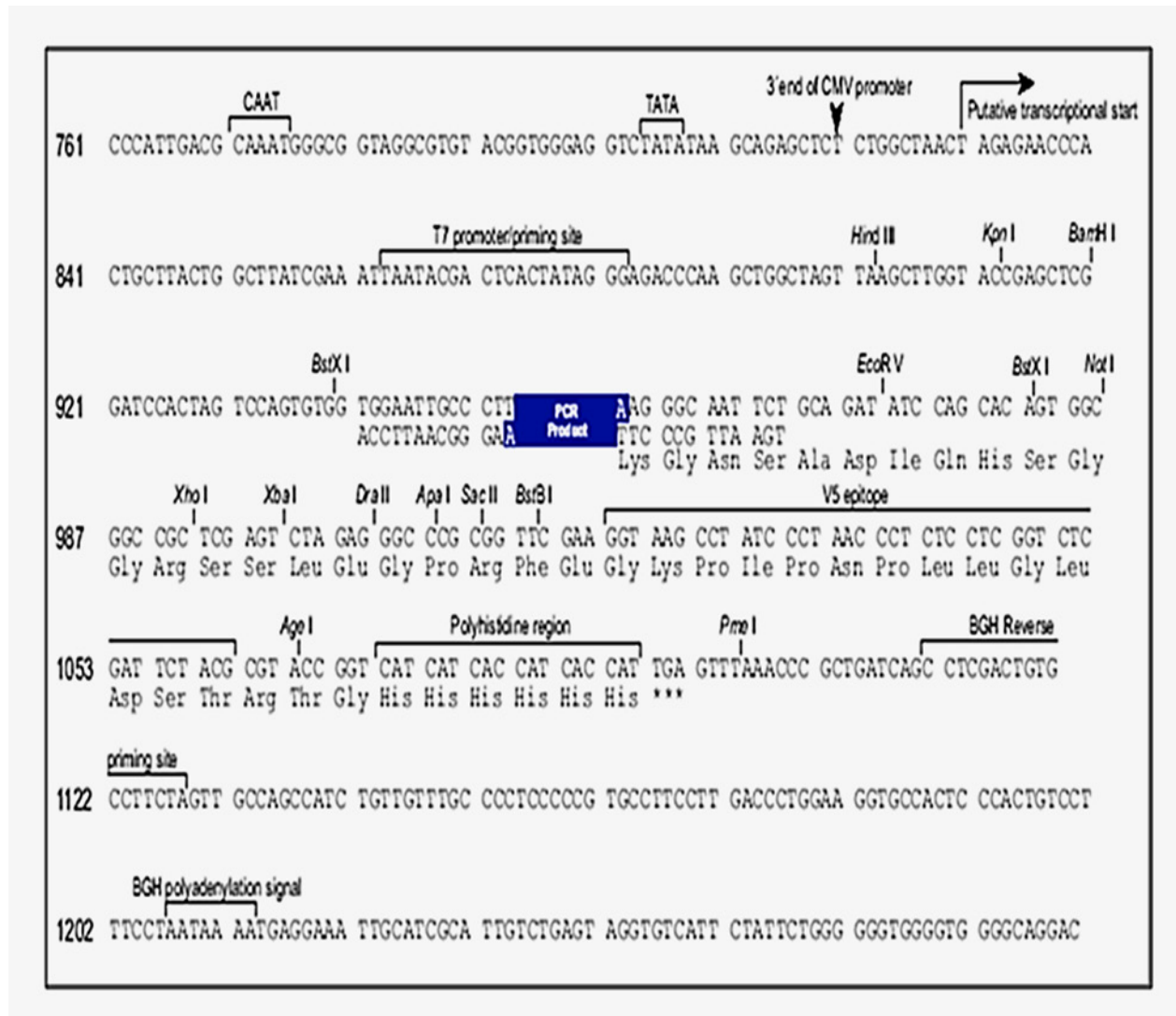


Abb. 18: Ligationsbereich des Inserts im Vektor-His-TOPO.

Zur Bestimmung der Orientierung des Inserts wurde eine Mini-Plasmidpräparation von 10 Klonen durchgeführt und die Orientierung des Inserts durch die Restriktionsanalyse bestimmt. Das korrekt orientierte Insert wurde zur Kontrolle noch sequenziert. Mit korrektem und überprüfem Plasmid (pcDNA31V5) wurden die INS-1 Zellen stabil transfiziert.

3.1.9.1 Nachweis von HMGB1 in transfizierten Zellen

Mittels Westernblotting wurde die Expression von HMGB1 in ausgewählten Klonen untersucht. Die Abkürzungen R1 (R1.1, R1.3 und R1.7) und R2 (R2.2, R2.3, R2.7 und R2.13) sollen darstellen, dass im Rahmen der PCR zwei unterschiedliche Antisense-Primer angewandt und später nach der Transformation in Zellkulturen weiter aufplattiert wurden. Eine Überexpression von HMGB1 konnte im Vergleich zur Kontrolle (Mock-Zellen) nicht in allen Klonen beobachtet und generell nicht nachgewiesen werden (Abb. 19).

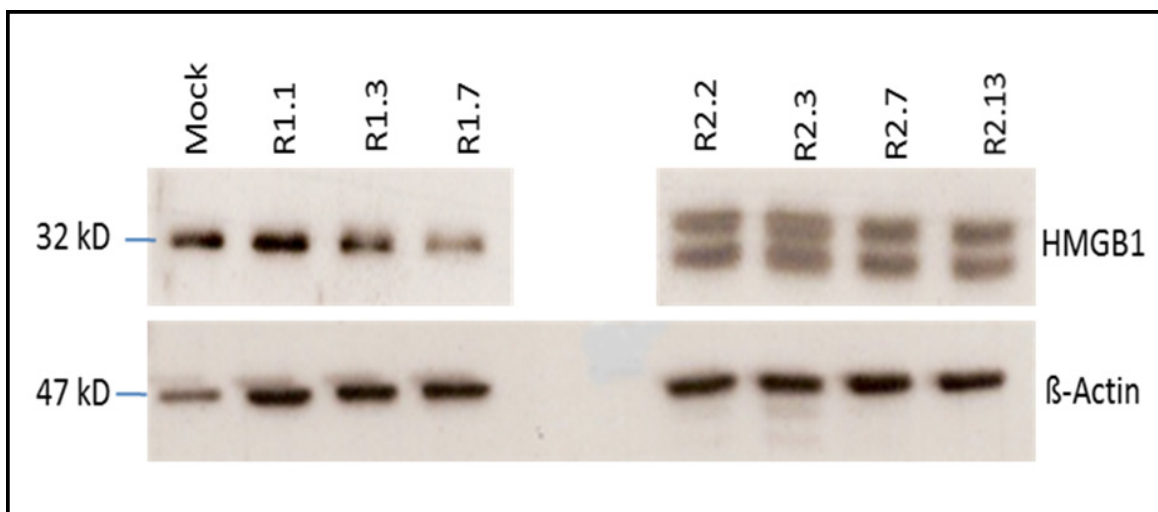


Abb. 19: Nachweis von HMGB1 in stabil transfizierten INS-1 Klonen. β -Actin zeigt eine gleichmäßige Proteinauftragung. M: Mock-Zellen. Gezeigt werden repräsentative Bilder von 3 Versuchen.

3.1.9.2 Nachweis von HMGB1 in INS-1 Klonen bei erhöhter Glukosekonzentration

Die stabil transfizierten INS-1 Zellen wurden unter bekannten Glukosekonzentrationen insgesamt 4 Tage inkubiert, wobei am 2. Tag ein Glukosemediumwechsel stattfand. Unter erhöhten Glukosebedingungen konnte bei R2 eine Herunterregulation im Vergleich zu R1 nicht nachgewiesen werden, welche für eine gelungene Überexpression von HMGB1 spricht (Abb. 20).

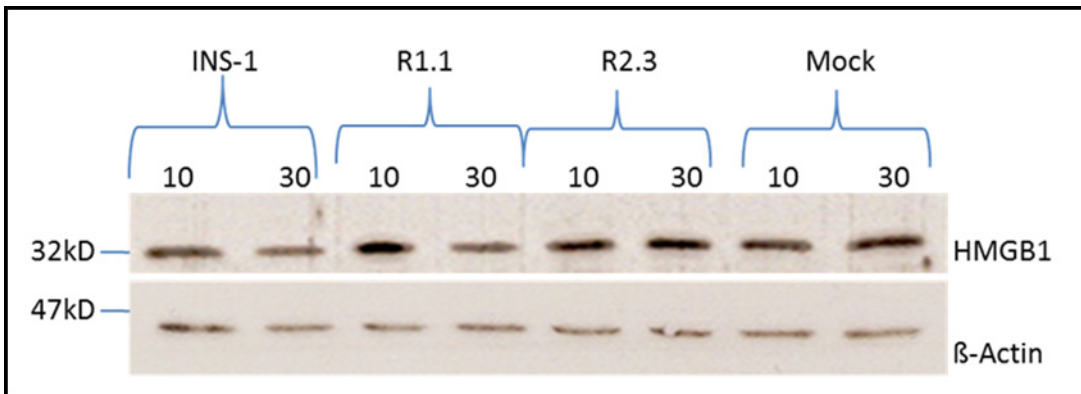


Abb. 20: Leichte Überexpression von HMGB1 unter 30 mM Glukose bei R2. β-Actin zeigt eine gleichmäßige Proteinauftragung. Gezeigt werden repräsentative Bilder von 13 Versuchen.

3.1.9.3 Caspase 3 Aktivität in den transfizierten INS-1 Zellen

Unter den definierten Glukosekonzentrationen wurde mit stabil transfizierten INS-1 Zellen zur Detektion von Caspase 3 ein Westerblot durchgeführt. Unter hohen Glukosekonzentrationen konnte eine Spaltung bzw. Aktivität im Vergleich zu den normalen INS-1 Zellen nicht nachgewiesen werden. Fazit: Eine leichtgradige HMGB1-Überexpression verhindert die Caspase 3-Spaltung (Abb. 21)

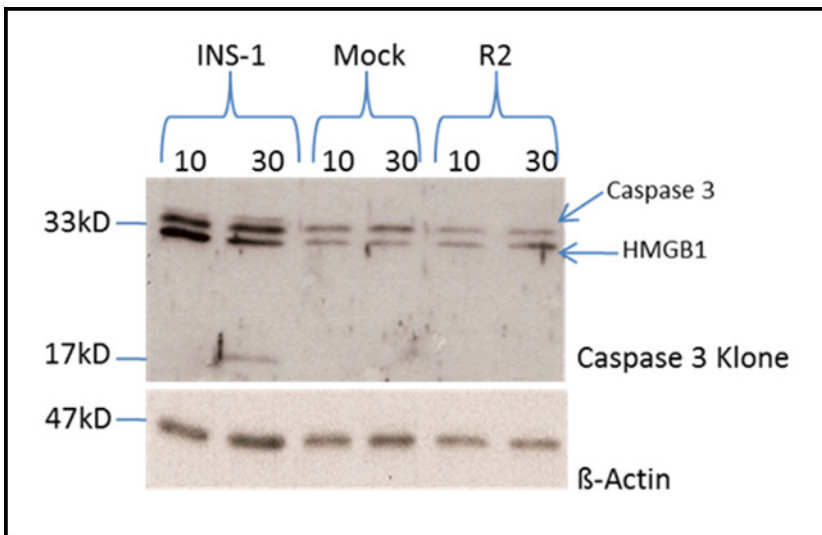


Abb. 21: Kein Nachweis von Caspase 3-Spaltung in stabil transfizierten INS-1 Zellen unter Hyperglykämie. β-Actin zeigt eine gleichmäßige Proteinauftragung. Gezeigt werden repräsentative Bilder von 4 Versuchen.

3.1.9.4 Nachweis der Zellproliferation der transfizierten INS-1 Zellen per MTT-Assay

Es wurde eine 4 tägige Inkubation mit Mediumwechsel am 2. Tag der INS-1 Zellen, der transfizierten INS-1 Zellen sowie ihrer Kontrollen mit jeweils 10 und 30 mM Glukose durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wurden mehrere MTT-Assays durchgeführt.

Die INS-1 Zellen zeigten unter Hochglukose im Vergleich zu der Kontrolle (10 mM Glukose) eine signifikante Abnahme der Zellproliferation. Bei den Mock-Klonen ergab sich im Vergleich zur Kontrolle kein erheblicher Unterschied. Die R1- und R2-Klone zeigten unter erhöhter Glukosekonzentration keinen Rückgang der Zellproliferation. Sie waren bei einem ca. 26%igem Abfall (R1) im Durchschnitt besser als die unbehandelten INS-1 Zellen unter 30 mM Glukose oder sie zeigten eine bessere Proliferationsrate als 100% (R2).

Die leichte Überexpression von HMGB1 führt bei erhöhten Glukosekonzentrationen zu einer nahezu ungestörten Proliferation der Zellen (Abb. 22).

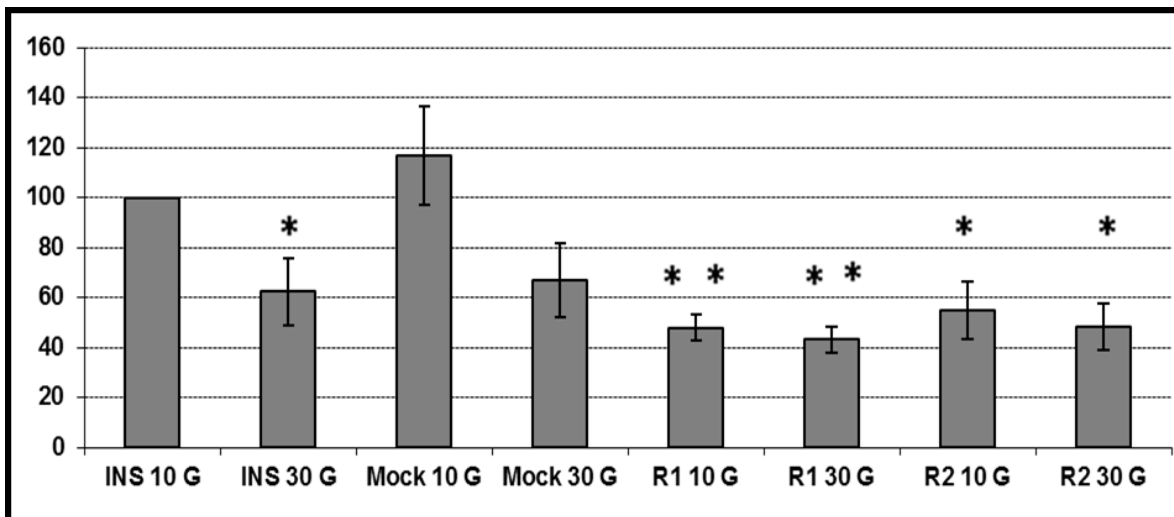


Abb. 22: Darstellung der Zellproliferation der normalen INS-1 Zellen unter den definierten Glukosekonzentrationen verglichen mit den R1- und R2- Klonen. INS-1: INS-1 Zellen, 10G: 10 mM Glukose, 30G: 30 mM Glukose, R1 und R2: transfizierte INS-1 Zellen, Mock-Zellen: transfizierte INS-1 Zellen mit leerem Vektor. Angaben sind Mittelwerte \pm S.E.M. (n=16) in Prozent [%] von Kontrolle INS (10 m G). * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle, ANOVA und post-hoc LSD-Test.

3.2 In vivo Untersuchungen

3.2.1 Nachweis von HMGB1 im Serum von Typ 2 Diabetikern

Bei einem Versuch mit Typ 2 Diabetikern (10) wurden vor Pioglitazonbehandlung die HMGB1-Spiegel in deren Seren mit denen der gesunden Kontrollpersonen (4) verglichen. Bei den Diabetikern waren geringere HMGB1-Spiegel nachweisbar. Der HMGB1-Spiegel der Patienten wurde vor und nach Pioglitazonbehandlung im Serum bestimmt. Es zeigte sich kein Unterschied im Ergebnis. Die HMGB1-Bande war in beiden Versuchsreihen herunterreguliert (Abb. 23).

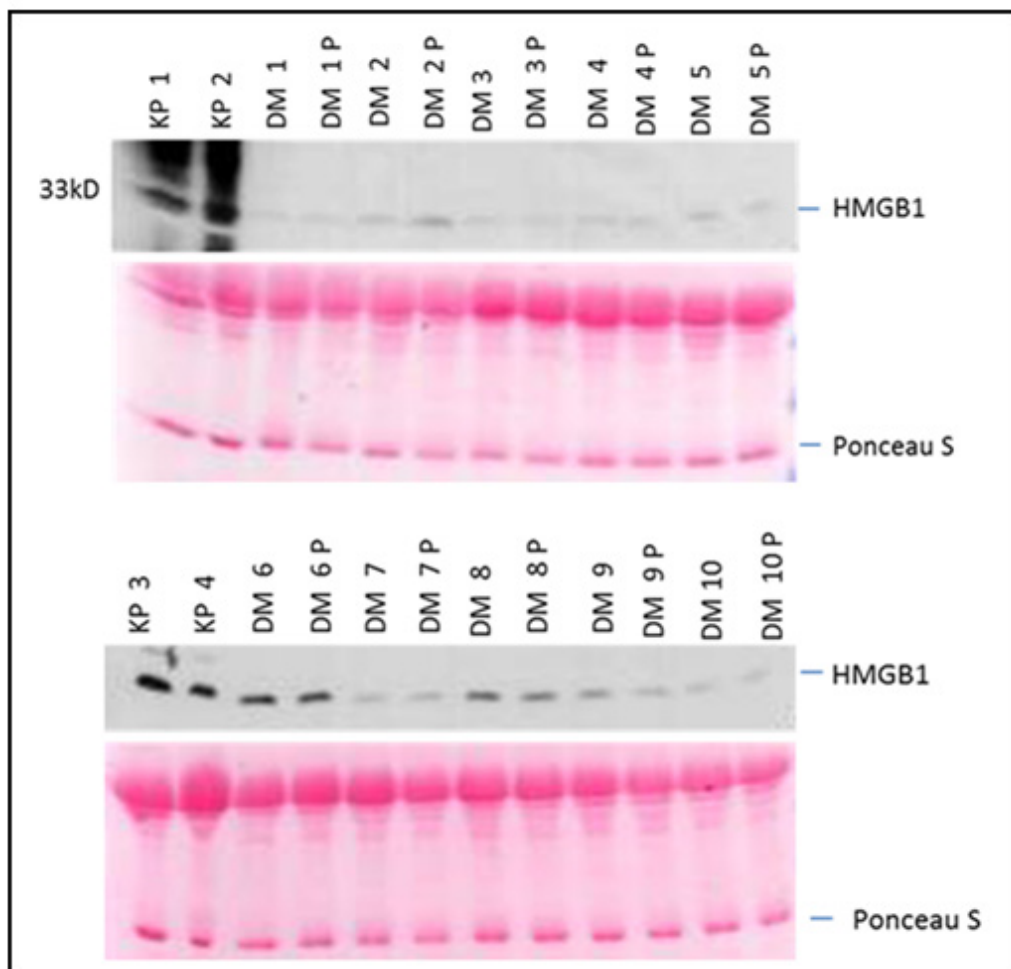


Abb. 23: HMGB1-Spiegel bei Typ 2 Diabetikern vor und nach Behandlung mit Pioglitazon. Die Seren von Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus weisen im Vergleich zu den Kontrollpersonen einen reduzierten HMGB1-Spiegel auf. Ponceau S zeigt eine gleichmäßige Proteinauftragung. KP 1-4: Kontrollperson, DM 1-10: Typ 2 Diabetiker, P: mit Pioglitazonbehandlung. Gezeigt werden repräsentative Bilder von 2 Versuchen.

4 Diskussion

In zahlreichen Studien ließ sich beobachten, dass eine chronische Hyperglykämie strukturelle und funktionelle toxische Schäden an Organen einschließlich Pankreasinseln verursacht, die durch die Aktivierung von multiplen biochemischen Mechanismen (Glukose-Autointoxikation, Proteinkinase C Aktivierung, H₂O₂, α -Ketoaldehyd und ROS [reactive oxygen species] etc.) induziert werden und folglich eine Schädigung der β -Inselzellen hervorrufen (Robertson 2004; Favaro et al. 2008). In physiologischen Konzentrationen hält ROS die Homöostase aufrecht. Durch eine Akkumulation verursacht es einen chronischen oxidativen Stress und entgegenwirkende Effekte, so dass vaskuläre, retinale und renale Schädigungen sowie apoptotische β -Inselzellen entstehen.

Kurzzeitiger Anstieg der Glukosekonzentration führt zur Regulation der β -Inselzellfunktion und Insulinsekretion. Dagegen beeinträchtigt eine chronische Hyperglykämie die β -Inselzellfunktion, indem es zu einer Abnahme bzw. zum Verlust der endogenen Insulinsekretion kommt. (Harmon et al. 2005; Laybutt et al. 2002; Zangen et al. 1997; Olson et al. 1993). Daraus resultiert eine verminderte Insulinpromotoraktivität. Folglich korreliert dies mit einer verminderten Genexpression, einer verminderten Bindung an den Transkriptionsfaktor sowie mit einer Abnahme des PDX-1 (pancreatic duodenal homeobox factor 1) und MafA (mammalian homologue of avian) (Harmon et al. 2005; Laybutt et al. 2002; Zangen et al. 1997; Olson et al. 1993).

Die Apoptose spielt eine fundamentale Rolle im Leben und ist unumgänglich in vielen biologischen Prozessen wie in der embryonalen Entwicklung, beim normalen Gewebewechsel und in der Metamorphose (Ashkenazi und Dixit 1998; Evan und Littlewood 1998; Green und Reed 1998; Hetts 1998; Saikumar et al. 1999; Thornberry und Lazebnik 1998). Besondere Aufmerksamkeit wurde der Frage entgegengebracht, wie man den apoptotischen β -Inselzellen entgegenwirkt oder deren Zelluntergang durch Glukoseexzess aufhält.

Einige Studien belegten, dass Antioxidantien (z.B. Nikotinamide, N-Acetylcystein) die durch Hyperglykämie bedingte supprimierte Insulinpromotoraktivität abschwächen. Folglich kommt es zur Zunahme der Insulinpromotoraktivität und Insulinbildung (Ye et al. 2006; Kamt et al. 1999). Haben noch andere Moleküle oder Proteine einen schützenden Effekt

auf die β -Inselzellen, die unter hyperglykämischen Umständen reguliert werden? Dieser Frage wurde nachgegangen.

In dieser Arbeit wurde anhand der 2D-Gel-Elektrophorese eine Trennung der Proteine aus INS-1-Zellen (Ratteninsulinomzellen), die unter 10 mM (180 mg/dl) als Kontrolle und unter 30 mM (540 mg/dl) Glukosekonzentration kultiviert wurden, vorgenommen.

Es wurde eine Reihe von Proteinen (Superoxiddismutase 1 (SOD 1), HMGB1, Caspase 3 Spaltung, ATP-Synthase, HSPC 263, Dipeptylpeptidase (DPD 3)) unter erhöhten Glukosebedingungen als herabreguliert nachgewiesen, die auf die Stärke der Regulation nicht weiter überprüft wurden. Wir fokussierten unser Interesse im Rahmen dieser Arbeit auf die Regulation von HMGB1 und Caspase 3.

In der Studie von Zini et al. wurden Katzen 10 Tage lang mit Glukoseinfusionen behandelt, um annähernd eine Blutglukosekonzentration von 25-30 mM (450 – 540 mg/dl) zu erreichen. Hierunter waren apoptotische β -Inselzellen und positive Caspase 3 Spaltprodukte im Plasma nachweisbar (Zini et al. 2009). In unserer Studie zeigte sich ebenso unter hyperglykämischen Bedingungen eine Caspase 3-Spaltung. Im Vergleich zu unbehandelten Katzen war eine dramatisch fortlaufende Abnahme der Plasma-Insulinspiegel bei den mit Glukose behandelten Katzen schon nach 2 Tagen und eine 50%ige Abnahme der β -Inselzellanzahl pro Pankreasfläche beobachtet worden (Zini et al. 2009). Damit führte die Hyperglykämie zu einer vermehrten Reduktion der β -Inselzellen des Pankreas und in der Folge zu einem Diabetes mellitus Typ I.

In unserer Studie wurde durch die Hyperglykämie eine Aktivierung von Caspase 3 ebenfalls nachgewiesen, zudem eine Herunterregulation von HMGB1. Am ehesten wird sie durch die Apoptose der β -Inselzellen in Gang gesetzt. Laut Zhou induzieren hohe Glukosekonzentrationen einen oxidativen Stress und Apoptose (Zhou et al. 2013).

In einer aktuellen Studie mit dem proapoptotischen Protein TXNIP (thioredoxin interacting protein) wurde gezeigt, dass unter der Hyperglykämie die Expression von TXNIP erhöht wird. Anschließend korreliert TXNIP positiv mit ROS und der proapoptotischen Caspase 3-Spaltung. Eine durch Hyperglykämie induzierte Caspase 3-Aktivierung konnte durch die Hemmung von TXNIP reduziert werden (Devi et al. 2013). Dieses könnte ein Ansatz sein, gegen die Apoptose der β -Inselzellen unter hyperglykämischen Bedingungen zu wirken.

Um den Effekt der hohen Glukosekonzentration auf die Überlebensfähigkeit der INS-1-Zellen zu analysieren, wurden in dieser Studie parallel unter denselben Bedingungen

MTT-Assays durchgeführt. Es konnte eine signifikante Abnahme der Zellproliferation bei 30 mM im Vergleich zur Kontrolle (10 mM Glukose) beobachtet werden. Ähnliche Erkenntnisse offenbart auch eine andere Arbeit (Leal et al. 2009). Sie konnten ebenso nachweisen, dass erhöhte Glukosekonzentrationen in retinalen Nervenzellen durch einen Caspase-abhängigen Mechanismus die Apoptose induzieren. Mittels MTT-Assays beobachtete man eine Abnahme der Zellproliferation. Das Resultat stimmt mit anderen in vitro Experimenten überein. Die Hyperglykämie erhöht die Apoptoserate der β -Zellen in menschlichen Inselzellen sowie in fetten Sandratten (Meadler et al. 2001, 2002; Donath et al. 1999).

Ferner erfolgte eine Zellfraktionierung der INS-1 Zellen in Zellkern und Zytosol, nachdem sie unter den definierten Glukosekonzentrationen (10 und 30 mM) behandelt wurden, um die Lokalisation von HMGB1 zu untersuchen. In diesem Experiment stellte sich vom 1. bis zum 2. Tag mittels Westernblot unter erhöhten Glukosebedingungen im Kern und Zytosol keine Regulation dar. Doch ab dem 3. Tag zeigte sich gleichermaßen eine Reduktion von HMGB1 im Kern und Zytosol (Abb.10). Am 4. Tag kam es zu einer deutlichen Abnahme der HMGB1-Expression in den Zellfragmenten der INS-1 Zellen. Unter erhöhten Glukosebedingungen findet eine Translokation vom Zellkern zum Zytosol oder umgekehrt nicht statt. Durch Hyperglykämie wird die Apoptose induziert (Zhou et al. 2013).

Kim et al. untersuchten die Beteiligung von HMGB1, RAGE und NF- κ B bei der Entstehung der diabetischen Nephropathie bei Ratten. HMGB1 kam gleichermaßen im Zytoplasma und im Zellkern vor. Am meisten war es im Nukleolus anzutreffen. Zuvor wurde bei diesen Zellen mittels Streptozocin eine Hyperglykämie verursacht. RAGE und NF- κ B wurden ebenso vermehrt freigesetzt. Kim et al. schlussfolgern, dass die hyperglykämieinduzierte Freisetzung von HMGB1 bei der Entstehung der diabetischen Nephropathie eine Rolle spielt (Kim et al. 2011). Die pathogenetische Rolle von HMGB1 ist vom RAGE abhängig sowie von der NF- κ B-Aktivierung (Kim et al. 2011).

Wir untersuchten die Wirkung von Pioglitazon (Actos®), einem Vertreter der Thiazolidindione. Bei den Thiazolidindionen handelt es sich um selektive Agonisten des Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). Die Aktivierung des PPAR γ Rezeptors führt zur Modulation zahlreicher Gene, die u. a. in die Kontrolle des Glukose- und Fettstoffwechsels verwickelt sind. Pioglitazon führte zu einer verbesserten Insulinsekretion bei Mausmodellen und bei Patienten mit Typ 2 Diabetes (Kubo K. 2002; Miyazaki et al. 2002). Pioglitazon verbessert die Insulinresistenz, besitzt eine suppressive Wirkung auf

die Lipoapoptose der β -Inselzellen, reduziert den Triglyzeridspiegel und übt eine protektive Wirkung auf die β -Inselzellen aus, indem es zu einer Reduktion von oxidativem Stress führt (Csaszar A. 2011; Kuru Karabas et al. 2013). Eine Reduktion von Sauerstoffradikalen führt zu einer geringeren NF κ B Aktivierung (Saitoh et al. 2007). Die protektive Wirkung von Pioglitazon auf die pankreatischen β -Inselzellen wird durch die signifikante Abnahme der Apoptoserate und der Caspase 3-Aktivierung gewährleistet (Wang et al. 2010).

In der Studie von Bell et al. wird gezeigt, dass eine Kombination von Pioglitazon mit Metformin zu einer signifikanten Abnahme der kardiovaskulären Ereignisse führt. In der Kombination Insulin mit Metformin konnte dieser Effekt nicht belegt werden (Bell et al. 2013). Bestimmte Patientengruppen würden durchaus von den positiven Wirkungen profitieren. Pioglitazon kann alleine oder in Kombination mit einem anderen Antidiabetikum eine Hypoglykämie verhindern. Außerdem kann Pioglitazon bei einer fortgeschrittenen Niereninsuffizienz eingesetzt werden (Kuru Karabas et al. 2013). Trotz der positiven Wirkungen dürfen Glitazone seit 2011 nicht mehr verordnet werden. Das verbliebene Pioglitazon (Actos®) wird nur noch in begründeten Einzelfällen von der gesetzlichen Krankenkasse erstattet. Troglitazon musste wegen Lebertoxizität vom Markt genommen werden, Rosiglitazon wegen erhöhter kardiovaskulärer Risiken. Retrospektive Studien haben ein vermehrtes Auftreten von Blasenkarzinom gezeigt (Barbalat et al. 2012). Vermutlich wird durch Pioglitazon die antiapoptotische Funktion von HMGB1 unterdrückt. Die Tumorzellen wachsen weiter. Da Pioglitazon über die Niere ausgeschieden wird und in der Harnblase akkumuliert, entsteht dort der Tumor. Eine Langzeittherapie mit Pioglitazon (>5 Jahre) bei Typ 2 Diabetikern zeigt ein hohes Risiko, Blasenkrebs zu entwickeln (Mamtani et al. 2012).

Aufgrund der positiven Wirkung von Pioglitazon haben wir in der hiesigen Studie die INS-1 Zellen unter den bekannten Glukosekonzentrationen behandelt und gleichzeitig einer Pioglitazonlösung ausgesetzt. Die INS-1 Zellen, die 4 Tage einer hohen Glukosebelastung und Pioglitazon ausgesetzt waren, zeigten keine Veränderung der Bandenintensität für HMGB1. Die Herunterregulation von HMGB1 unter 30 mM Glukose wurde durch Pioglitazon ersichtlich aufgehoben. Unter Pioglitazon wird die HMGB1-Regulation nicht beeinflusst. Parallel beobachteten wir eine nahezu unveränderte Proliferation der INS-1 Zellen unter Hyperglykämie (30 mM) und Pioglitazoneinfluss im Vergleich zu den

INS-1 Zellen, die nur einer Hyperglykämie (30 mM) ausgesetzt waren und einen drastischen Abfall der Zellproliferation lieferten.

Wei et al. (2013) untersuchten aufgrund der proinflammatorischen Eigenschaften HMGB1 und seine Rolle in dem entzündlichen Verlauf der Multiplen Sklerose (MS). Hierbei handelt es sich um eine chronisch entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Der verantwortliche Mechanismus für die Entstehung von MS ist unklar. Wei et al. belegten, dass HMGB1 und seine Rezeptoren (RAGE, TLR2, und TLR4) in akuten Läsionen im Rahmen der MS reichlich freigesetzt werden (Wei et al. 2013). HMGB1 ist ein bedeutender Biomarker des ZNS und trägt durch Infiltration der Makrophagen und der Mikroglia zu einer Chronifizierung des entzündlichen Prozess bei MS bei. Eine Wiederherstellung des Gleichgewichts von HMGB1 und deren Rezeptoren ist für die Aufrechterhaltung der Wiederherstellung von HMGB1 äußerst wichtig (Wei et al. 2013).. Als ein therapeutisches Vorgehen könnte man Pioglitazon anwenden, da dieses wie beschrieben eine Unterdrückung von HMGB1 bewirkt. In Anbetracht dessen könnte es bei MS wirksam sein.

Wir konnten in den Seren von Typ 2 Diabetikern reduzierte HMGB1-Spiegel vor und nach Pioglitazonbehandlung nachweisen. Es zeigten sich identische Ergebnisse. In unseren in vitro Versuchen konnten wir nachweisen, dass unter Hyperglykämie und Pioglitazon die HMGB1-Expression in den INS-1 Zellen im Vergleich zu 10 mM Glukose und Pioglitazon nicht runterreguliert wird. Aber eine Behandlung der INS-1 Zellen mit 10 mM Glukose und Pioglitazon führt zu einem fast 90%igen Zerfall der Zellen. Im Zusammenschau der Befunde würden fortgeschrittene Diabetiker von einer Pioglitazonbehandlung profitieren.

In den bisherigen Versuchen scheint Pioglitazon die β -Inselzellen vor der Apoptose zu schützen. Durch seine protektive Wirkung bleibt HMGB1 unter anhaltender Glukosebelastung verschont. Dies ist an der unveränderten Bandenintensität für das HMGB1 unter Glukose- und Pioglitazonbelastung zu erkennen (Abb. 11 c). Vermutlich wird die Herabregulation des HMGB1 auf einem noch nicht identifizierten Stoffwechselweg verhindert und seine antiapoptotische Funktion dadurch aufrechterhalten. Außerdem belegten die parallel durchgeführten MTT-Assays unter denselben Voraussetzungen, dass die INS-1 Zellen unter 10 mM Glukose und Pioglitazon im Vergleich zu den Zellen, die 30 mM Glukose und Pioglitazon ausgesetzt waren, einen drastischen Abfall der Überlebensrate, die

nahezu durchschnittlich bei 18% lag, aufweisen (Abb. 14). Eine Behandlung mit Pioglitazon in Verbindung mit 10 mM Glukose führt zum Zelltod. Der Grund dafür könnte sein, dass Pioglitazon unter normalen Glukosebedingungen eine toxische Wirkung auf die INS-1 Zellen ausübt. In einer Studie wurde beschrieben, dass Pioglitazon durch seine genotoxische Eigenschaft zu einer DNA-Schädigung führt (Alzoubi et al. 2012). Bei dem o.g. Versuch kommt es am ehesten durch eine Genmanipulation zu einem konsekutiven Untergang der Zellen. Allerdings wird die genotoxische Wirkung unter hyperglykämischen Bedingungen aus noch ungeklärtem Grund aufgehoben. (Abb. 11 b, c und 12).

Wir untersuchten in den INS-Zellen, ob in vitro eine Glukoseverstoffwechselung stattfindet. Hierzu wendeten wir die GOD-PAP Methode an (enzymatischer Farbstest für Glukose). Die Bestimmung der Glukosekonzentration mit und ohne Pioglitazon erfolgte nach enzymatischer Oxidation in Gegenwart von Glukoseoxidase. Jedoch blieben die Glukosekonzentrationen unverändert. Eine Verstoffwechselung der Glukoselösung durch die β -Inselzellen fand nicht statt.

Pioglitazon ist in vitro ein Stressfaktor für die Zellen. In der Studie von Redondo et al. 2005 wurde beschrieben, dass Pioglitazon in vaskulären glatten Muskelzellen die Apoptose induziert. Die Muskelzellen von diabetischen und nicht-diabetischen Patienten wurden unter hyperglykämischen Bedingungen isoliert. Dieser Effekt wird über den PPAR γ Rezeptor vermittelt, weil das ein Triggerfaktor zur Einführung des Zelltodes der glatten Muskelzellen ist und durch Thiazolidine induziert wird (Redondo et al. 2005).

In einer jüngeren Studie wurde außerdem an einem Rattenmodell gezeigt, dass Pioglitazon zu einer dosisabhängigen DNA-Schädigung in Hepatozyten und Lymphozyten im peripheren Blut führt (Bedir et al. 2008). Zahlreiche andere Studien zeigten auch, dass Diabetes mellitus zu oxidativen Stress und dadurch zu einer DNA-Schädigung beitragen kann (Dandona et al. 1996; Collins et al. 1998; Pan et al. 2007). Die INS-1 Zellen, die unter physiologischen Glukosekonzentrationen einer Pioglitazonbehandlung ausgesetzt waren, beinhalten ein potentielles Risiko für Blasenkarzinom (Faillie et al. 2013).

In dieser Studie haben wir nachgewiesen, dass HMGB1 unter erhöhten Glukosekonzentrationen herabreguliert wird. Wenn diese Zellen parallel einer Glukosebelastung und einer Pioglitazonbehandlung ausgesetzt waren, wirkte Pioglitazon der Herabregulation von HMGB1 entgegen im Vergleich zu den INS-1 Zellen mit hoher Glukosebelastung ohne Pioglitazonzusatz. Die durchgeführten MTT-Assays zeigten identische Ergebnisse. Die mit

hoher Glukosekonzentration behandelten INS-1 Zellen zeigten eine signifikante Abnahme der Überlebensrate verglichen mit den Zellen, die eine hohe Glukosebelastung und eine Pioglitazonbehandlung erhielten. Diese INS-1 Zellen signalisierten im Vergleich zur Kontrolle (10 mM Glukoselösung mit Pioglitazonzusatz) eine Überlebensrate von 70%.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Pioglitazon unter dauerhafter Glukosebelastung die Apoptose und den Funktionsverlust der β -Inselzellen verhindert. Unterstützend zeigt Zeender et al., dass Pioglitazon das Überleben der Inselzellen verbessert und die Funktion sowohl in den Typen 1 und 2 Diabetes als auch nach Inselzelltransplantationen sicherstellt und bewahrt (Zeender et al. 2004).

Um darzustellen, ob nun ein Übermaß von HMGB1 den programmierten Zelltod funktionell aufhalten kann, wurde eine Überexpression von HMGB1 in INS-1 Zellen versucht. Allerdings hatte eine signifikante Überexpression von HMGB1 im Vergleich zur Kontrolle (Mock) nicht stattgefunden. Trotzdem wurden mit den stabilen Klonen die Versuchsreihen durchgeführt. Die Überlegung war, dass durch den Besitz des Vektors mit seiner Ampicillin-Resistenz eine leichte Überexpression stattgefunden hat, die aber in den Untersuchungen nicht zur Darstellung kommt, da die Nachweisgrenze nicht erreicht wurde.

Es ist bekannt, dass eine hohe Expressionsrate von HMGB1 die Caspase 3- und Caspase 9-Aktivität supprimieren und zudem die Apoptose über eine c-IAP2 Induktion hemmen kann (Völp et al. 2006). Darüber hinaus ist das HMGB1 in der Lage, Säugetierzellen gegen verschiedene Signale zur Einführung des Zelltodes, einschließlich gegen Ultraviolett-Strahlen, CD95-, TRAIL-, Caspase 8- und Bax zu schützen (Brezniceanu et al. 2003).

Theoretisch würde eine Überexpression von HMGB1 die Vitalitätsrate der INS-1 Zellen deutlich bessern.

Eine Überexpression von HMGB1 entfaltet auch kontraverse Funktionen. Die Überexpression von HMGB1 aktiviert die Caspase-1-Spaltung und fördert das Wachstum von hepatocellulärem Karzinom und die Bildung von Metastasen (Yan et al. 2012). Ferner wurde nachgewiesen, dass eine HMGB1-Überexpression zum kolorektalen Karzinom führt und mit einer schlechten Prognose einhergeht. (Yao et al. 2010). In dieser Studie diente HMGB1 als ein Tumormarker zum Nachweis des kolorektalen Karzinoms.

Es gibt bisher wenige Erkenntnisse darüber, was eine HMGB1-Überexpression, bezogen auf β -Inselzellen, die erhöhten Glukosekonzentrationen ausgesetzt sind, verursacht.

Durch weitere Versuchsreihen muss eine Nutzen-/Risikoabschätzung von HMGB1-Überexpression bei Typ 2 Diabetikern experimentell erforscht werden, da bei einer Überexpression von HMGB1 die Prognose nicht bekannt ist.

Zahlreiche Studien verdeutlichen, dass eine NFκB-Aktivierung einen bedeutenden proapoptotischen Stoffwechselweg für die (humanen) β-Inselzellen darstellt. Übereinstimmend damit wurde in verschiedenen Experimenten gezeigt, dass eine Blockade der NFκB-Aktivierung die β-Inselzellen vor dem programmierten Zelltod schützt (Baker et al. 2001; Contreras et al. 2002; Dupraz et al. 2000; Giannoukakis et al. 2000; Grey et al. 1999; Grey et al. 2003; Heimberg et al. 2001; Maedler et al. 2002; Rehmann et al. 2003; Riachy et al. 2002).

In der Zusammenschau der Studienergebnisse spielt HMGB1 eine wichtige Rolle bei der Pathophysiologie des Diabetes mellitus. Die Herabregulation von HMGB1 unter erhöhten Glukosebedingungen leitet auf unbekanntem Wege die Apoptose ein. Diesem programmierten Zelltod kann mit einer Pioglitazonbehandlung entgegengewirkt werden. Dabei verhindert Pioglitazon die Herabregulation von HMGB1 und verbessert die Überlebensrate von INS-1 Zellen. Diabetiker haben einen erniedrigten HMGB 1- Spiegel, aber es konnte durch Pioglitazon keine Erhöhung der HMGB1-Spiegel gezeigt werden. Für die MS-Remission könnte Pioglitazon in Zukunft als Therapieansatz unverzichtbar sein.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Glukose auf die HMGB1-Regulation von Glukose der β -Inselzellen untersucht. INS-1 Zellen, die mit 10 und 30 mM Glukose behandelt wurden, wurden mittels 2 D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Wir untersuchten die Proteine HMGB1 und Caspase 3, die anschließend mit Hilfe von Westernblot verifiziert wurden. Unter der Hyperglykämie zeigte sich eine Herunterregulation von HMGB1 sowie eine Aktivierung von Caspase 3. Ferner wurde mit Hilfe von MTT-Assays unter hyperglykämischen Bedingungen eine signifikante Abnahme der Zellproliferation nachgewiesen.

Bei der Zellfraktionierung konnte unter erhöhter Glukosebelastung eine Reduktion von HMGB1 sowohl im Zellkern als auch im Zytosol dargestellt werden. Eine zusätzliche Behandlung mit Pioglitazon konnte interessanterweise eine Herabregulation von HMGB1 verhindern. Die mit 10 mM Glukose und Pioglitazon behandelten INS-Zellen zeigten eine deutliche Unterexpression bzw. eine starke Beeinträchtigung der Zellproliferation. In Anbetracht dessen entfaltet Pioglitazon seine protektive Wirkung unter erhöhten Glukosebedingungen. Bei den Diabetikern wurden vor und nach der Pioglitazonbehandlung erniedrigte HMGB1-Spiegel nachgewiesen. Eine Erhöhung der HMGB1-Spiegel konnte unter Einfluss von Pioglitazon nicht erzielt werden.

In der Zusammenschau der Befunde ist anzunehmen, dass Pioglitazon seine protektive Wirkung erst im fortgeschrittenen Stadium des Diabetes Mellitus entfaltet. Desweiteren entfaltet Pioglitazon seine protektive Wirkung auf die Karzinomzellen, so dass ein Harnblasenkarzinom oder Kolonkarzinom verursacht wird. In Anbetracht dessen wurden Glitazone 2011 vom Markt genommen. Pioglitazon soll aber ggf. bei MS wirksam sein. Um mögliche antiapoptotische Funktionen von HMGB1 zu untersuchen, wurde mittels RT-PCR eine Klonierung, dann eine stabile Transfektion durchgeführt. In den durchgeführten Westernblots zeigte sich eine leichtgradige HMGB1-Überexpression. Wir gingen von einer leichten Überexpression aus, da sich die stabil transfizierten INS-1 Zellen im Vergleich zu den normalen INS-1 Zellen anders verhielten. Unter erhöhten Glukosekonzentrationen stellte sich keine Herunterregulation der HMGB1-Bande dar und die Zellproliferation der INS-1 Klone war deutlich gebessert. Eine Caspase 3-Spaltung konnte unter erhöhten

Glukosebedingungen nicht nachgewiesen werden, somit verhindert eine HMGB1-Überexpression die Aktivierung von Caspase 3.

5.1 Summary

In the present study the influence of glucose was examined for the HMGB1-regulation of glucose β -islet cells. We treated INS-1 cells with 10 and 30 mM glucose and then separated the proteins by 2-D gel electrophoresis. We investigated the proteins HMGB1 and caspase-3, which was subsequently verified by means of Western blot. Under hyperglycemia we showed a downregulation of HMGB1 and an activation of caspase 3. Under hyperglycemic conditions we observed a significant decrease in cell proliferation by MTT-Assay.

By cell fractionation a reduction of HMGB1 both in the nucleus and in the cytosol could be shown at elevated glucose levels. Interestingly an additional treatment with pioglitazone could interestingly prevent the downregulation of HMGB1. Combined treatment with 10 mM glucose and pioglitazone of INS cells showed a significant under-expression and a strong impairment of the cell proliferation. In summary pioglitazone exerts its protective effect under elevated glucose conditions. In the diabetic patients decreased HMGB1 levels were detected before and after pioglitazone therapy. An increase in HMGB1 levels could not be achieved under the influence of pioglitazone.

The data lead to the assumption that pioglitazone exerts its protective effect in the late stage of diabetes mellitus. Furthermore pioglitazone exerts its protective effect on carcinoma cells possibly leading to bladder cancer or colon carcinoma. On the bases of facts glitazones were taken off the market in 2011. But pioglitazone could possibly be effective in MS.

To investigate possible anti-apoptotic functions of HMGB1 we used RT-PCR cloning, then performed a stable transfection. In the performed Western blots we showed low grade HMGB1 overexpression.

We went from a slight over-expression, as the stably transfected INS-1 cells compared to the normal INS-1 cells behaved differently. Under elevated glucose levels no downregulation of HMGB1 was found and cell proliferation of INS-1 clones was significantly improved. A caspase-3 cleavage under elevated glucose conditions could not be detected, thus HMGB1 overexpression prevents the activation of caspase 3.

6 Literaturverzeichnis

- Aiello LP, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris FL 3rd, Klein R. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 1998 Jan;21(1):143-56.
- Alzoubi K, Khabour O, Hussain N, Al-Azzam S, Mhaidat N. Evaluation of vitamin B12 effects on DNA damage induced by pioglitazone. *Mutat Res*. 2012 Oct 9;748(1-2):48-51.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.
- Baker MS, Chen X, Cao XC, Kaufman DB. Expression of a dominant negative inhibitor of NF-kappaB protects MIN6 beta-cells from cytokine-induced apoptosis. *J Surg Res*. 2001 May 15;97(2):117-22.
- Barbalat Y, Dombrovskiy VY, Weiss RE. Association between pioglitazone and urothelial bladder cancer. *Urology*. 2012 Jul;80(1):1-4.
- Bedir A, Aliyazicioglu Y, Bilgici B, Yurdakul Z, Uysal M, Suvaci DE, Okuyucu A, Kahraman H, Hökelek M, Alvur M. Assessment of genotoxicity in rats treated with the antidiabetic agent, pioglitazone. *Environ Mol Mutagen*. 2008 Apr;49(3):185-91.
- Bell DS, Patil HR, O'Keefe JH. Divergent effects of various diabetes drugs on cardiovascular prognosis. *Rev Cardiovasc Med*. 2013;14(2-4):e107-22.
- Bianchi ME. Significant (re)location: how to use chromatin and/or abundant proteins as messages of life and death. *Trends Cell Biol*. 2004 Jun;14(6):287-93.
- Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, Rubartelli A, Agresti A, Bianchi ME. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J*. 2003 Oct 15;22(20):5551-60.
- Brezniceanu ML, Völz K, Bösner S, Solbach C, Lichter P, Joos S, Zörnig M. HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *FASEB J*. 2003 Jul;17(10):1295-7.
- Broedl UC, Göke B. [Molecular diagnosis of diabetes mellitus]. *Internist (Berl)*. 2006 Jan;47(1):47-54.
- Bustin M, Crippa MP, Pash JM. Immunochemical analysis of the exposure of high mobility group protein 14 and 17 surfaces in chromatin. *J Biol Chem*. 1990 Nov 25;265(33):20077-80.
- Bustin M. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci*. 2001 Mar;26(3):152-3.

- Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtländer T, Ferrier P, Ferrari S, Bianchi ME. The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet.* 1999 Jul;22(3):276-80.
- Chung HW, Lee SG, Kim H, Hong DJ, Chung JB, Stroncek D, Lim JB. Serum high mobility group box-1 (HMGB1) is closely associated with the clinical and pathologic features of gastric cancer. *J Transl Med.* 2009 May 28;7-38.
- Clore JN, Stillman J, Sugerman H. Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2000 Jun;49(6):969-74.
- Collins AR, Raslová K, Somorovská M, Petrovská H, Ondrusová A, Vohnout B, Fábry R, Dusinská M., DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker, 1998. *Free Radic Biol Med.* 25(3):373-7.
- Contreras JL, Smyth CA, Bilbao G, Young CJ, Thompson JA, Eckhoff DE. 17beta-Estradiol protects isolated human pancreatic islets against proinflammatory cytokine-induced cell death: molecular mechanisms and islet functionality, 2002. *Transplantation.* 15;74(9):1252-9.
- Császár A. [Anti-atherosclerotic effect of pioglitazone--the first evidence of the role of triglyceride/HDL ratio]. *Lege Artis Med.* 2011 Feb;21(2):105-11.
- Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T., Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus, 1996. *Lancet.* 17;347(8999):444-5.
- DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes, 1997. *Diabetes* 5:177-269.
- Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Müller S, Resnati M, Sanvito F, Arrigoni G, Bianchi ME. The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 2001 Mar 19;152(6):1197-1206.
- Devi TS, Hosoya K, Terasaki T, Singh LP. Critical role of TXNIP in oxidative stress, DNA damage and retinal pericyte apoptosis under high glucose: Implications for diabetic retinopathy. *Exp Cell Res.* 2013 Apr 15;319(7):1001-12.
- Dietel M, Dudenhausen J, Suttorp N, Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. *Innere Medizin* 1. Berlin: ABW-Wissenschaftsverlag; 2002; 2307-2337.
- Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N. Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes.* 1999 Apr;48(4):738-44.
- Dumitriu IE, Baruah P, Bianchi ME, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2005 Jul;35(7):2184-90.
- Dumitriu IE, Baruah P, Valentinis B, Voll RE, Herrmann M, Nawroth PP, Arnold B, Bianchi ME, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Release of high mobility group box 1 by dendritic

- cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol.* 2005 Jun 15;174(12):7506-15.
- Dupraz P, Cottet S, Hamburger F, Dolci W, Felley-Bosco E, Thorens B. Dominant negative MyD88 proteins inhibit interleukin-1beta /interferon-gamma-mediated induction of nuclear factor kappa B-dependent nitrite production and apoptosis in beta cells, 2000. *J Biol Chem.* 1;275(48):37672-8.
- Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1317-22.
- Faillie JL, Petit P, Montastruc JL, Hillaire-Buys D. Scientific Evidence and Controversies About Pioglitazone and Bladder Cancer: Which Lessons Can Be Drawn? *Drug Saf.* 2013 Jul 20. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23868339.
- Favaro E, Miceli I, Bussolati B, Schmitt-Ney M, Cavallo Perin P, Camussi G, Zanone MM. Hyperglycemia induces apoptosis of human pancreatic islet endothelial cells: effects of pravastatin on the Akt survival pathway. *Am J Pathol.* 2008 Aug;173(2):442-50.
- Garcia-Faroldi G, Melo FR, Rönnerberg E, Grujic M, Pejler G. Active caspase-3 is stored within secretory compartments of viable mast cells. *J Immunol.* 2013 Aug 1;191(3):1445-52.
- Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, Rubartelli A. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep.* 2002 Oct;3(10):995-1001.
- Gastaldelli A, Baldi S, Pettiti M, Toschi E, Camastra S, Natali A, Landau BR, Ferrannini E. Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output in humans: a quantitative study. *Diabetes.* 2000 Aug;49(8):1367-73.
- Giannoukakis N, Rudert WA, Trucco M, Robbins PD, Protection of human islets from the effects of interleukin-1beta by adenoviral gene transfer of an Ikappa B repressor. 2002. *J Biol Chem.* 24;275(47):36509-13.
- Gong Q, Xu JF, Yin H, Liu SF, Duan LH, Bian ZL. Protective effect of antagonist of high-mobility group box 1 on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Scand J Immunol.* 2009 Jan;69(1):29-35.
- Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem.* 1973 Sep 21;38(1):14-9.
- Goodwin GH, Johns EW. The isolation and purification of the high mobilitygroup (HMG) nonhistone chromosomal proteins. *Methods Cell Biol.* 1977;16:257-67.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1309-12.
- Grey ST, Arvelo MB, Hasenkamp W, Bach FH, Ferran C. A20 inhibits cytokine-induced apoptosis and nuclear factor kappaB-dependent gene activation in islets. 1999. *J Exp Med.* 18;190(8):1135-46.

- Grey ST, Longo C, Shukri T, Patel VI, Csizmadia E, Daniel S, Arvelo MB, Tchipashvili V, Ferran C. Genetic engineering of a suboptimal islet graft with A20 preserves beta cell mass and function. 2003. *J Immunol.* 15;170(12):6250-6.
- Groop L. Pathogenesis of type 2 diabetes: the relative contribution of insulin resistance and impaired insulin secretion. *Int J Clin Pract Suppl.* 2000 Oct;(113):3-13.
- Hagiwara S, Iwasaka H, Hasegawa A, Koga H, Noguchi T. Effects of hyperglycemia and insulin therapy on high mobility group box 1 in endotoxin-induced acute lung injury in a rat model. *Crit Care Med.* 2008 Aug;36(8):2407-13.
- Harmon JS, Stein R, Robertson RP. Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells. *J Biol Chem.* 2005 Mar 25;280(12):11107-13.
- Heimberg H, Heremans Y, Jobin C, Leemans R, Cardozo AK, Darville M, Eizirik DL. Inhibition of cytokine-induced NF-kappaB activation by adenovirus-mediated expression of a NF-kappaB super-repressor prevents beta-cell apoptosis. 2001. *Diabetes.* 50(10):2219-24.
- Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *Jama* 1998 Jan 28;279(4):300-7.
- Hoorens A, Van de Casteele M, Klöppel G, Pipeleers D. Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program. *J Clin Invest.* 1996 Oct 1;98(7):1568-74.
- Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *J Biol Chem.* 1995 Oct 27;270(43):25752-61.
- Huttunen HJ, Fages C, Kuja-Panula J, Ridley AJ, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Res.* 2002 Aug 15;62(16):4805-11.
- Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem.* 1999 Jul 9;274(28):19919-24.
- Kamat JP, Devasagayam TP. Nicotinamide (vitamin B3) as an effective antioxidant against oxidative damage in rat brain mitochondria. *Redox Rep.* 1999;4(4):179-84.
- Khera T, Martin J, Riley S, Steadman R, Phillips AO. Glucose enhances mesangial cell apoptosis. *Lab Invest.* 2006 Jun;86(6):566-77.
- Kim J, Sohn E, Kim CS, Jo K, Kim JS. The role of high-mobility group box-1 protein in the development of diabetic nephropathy. *Am J Nephrol.* 2011;33(6):524-9.

- Kokkola R, Sundberg E, Ulfgren AK, Palmblad K, Li J, Wang H, Ulloa L, Yang H, YanXJ, Furie R, Chiorazzi N, Tracey KJ, Andersson U, Harris HE. High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum.* 2002 Oct;46(10):2598-603.
- Kubo K. Effect of pioglitazone on blood proinsulin levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocr J.* 2002 Jun;49(3):323-8.
- Kuru Karabas M, Ayhan M, Guney E, Serter M, Meteoglu I. The effect of pioglitazone on antioxidant levels and renal histopathology in streptozotocin-induced diabetic rats. *ISRN Endocrinol.* 2013 May 9;2013:858690.
- Laybutt DR, Sharma A, Sgroi DC, Gaudet J, Bonner-Weir S, Weir GC. Genetic regulation of metabolic pathways in beta-cells disrupted by hyperglycemia. *J Biol Chem.* 2002 Mar 29;277(13):10912-21.
- Leal EC, Aveleira CA, Castilho AF, Serra AM, Baptista FI, Hosoya K, Forrester JV, Ambrósio AF. High glucose and oxidative/nitrosative stress conditions induce apoptosis in retinal endothelial cells by a caspase-independent pathway. *Exp Eye Res.* 2009 May;88(5):983-91.
- Livesey KM, Kang R, Vernon P, Buchser W, Loughran P, Watkins SC, Zhang L, Manfredi JJ, Zeh HJ 3rd, Li L, Lotze MT, Tang D. p53/HMGB1 complexes regulate autophagy and apoptosis. *Cancer Res.* 2012 Apr 15;72(8).
- Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2005 Apr;5(4):331-42.
- Lowe WL. Genetics of diabetes, in *Principles of Molecular Medicine*. JL(ed). Totowa. NJ Humana. 1998; pp 433-442.
- Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, Kaiser N, Halban PA, Donath MY. Glucose-induced beta cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest.* 2002 Sep;110(6):851-60.
- Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, Kaiser N, Donath MY. Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes.* 2001 Aug;50(8):1683-90.
- Mamtani R, Haynes K, Bilker WB, Vaughn DJ, Strom BL, Glanz K, Lewis JD. Association between longer therapy with thiazolidinediones and risk of bladder cancer: a cohort study. *J Natl Cancer Inst.* 2012 Sep 19;104(18):1411-21.
- Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jun;87(6):2784-91.
- Murua Escobar H, Meyer B, Richter A, Becker K, Flohr AM, Bullerdiek J, Nolte I. Molecular characterization of the canine HMGB1. *Cytogenet Genome Res.* 2003;101(1):33-8.

- Nadatani Y, Watanabe T, Tanigawa T, Ohkawa F, Takeda S, Higashimori A, Sogawa M, Yamagami H, Shiba M, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Takeuchi K, Arakawa T. High-Mobility Group Box 1 Inhibits Gastric Ulcer Healing through Toll-Like Receptor 4 and Receptor for Advanced Glycation End Products. *PLoS One*. 2013 Nov 11;8(11).
- Naglova H, Bucova M. HMGB1 and its physiological and pathological roles. *Bratisl Lek Listy*. 2012;113(3):163-71.
- O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ. Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J Pathol*. 1996 Feb;178(2):176-81.
- Olson LK, Redmon JB, Towle HC, Robertson RP. Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. *J Clin Invest*. 1993 Jul;92(1):514-9.
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993 Aug 27;74(4):609-19.
- Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, Cossu G, Bianchi ME. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol*. 2004 Feb 2;164(3):441-9.
- Pan HZ, Chang D, Feng LG, Xu FJ, Kuang HY, Lu MJ. Oxidative damage to DNA and its relationship with diabetic complications. *Biomed Environ Sci*. 2007 Apr;20(2):160-3.
- Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem*. 2004 Feb 27;279(9):7370-7.
- Pugliese A. Unraveling the genetics of insulin-dependent type 1A diabetes. *Diabetes* 1999;7:39.
- Rauvala H, Merenmies J, Pihlaskari R, Korkolainen M, Huhtala ML, Panula P. The adhesive and neurite-promoting molecule p30: analysis of the amino-terminal sequence and production of antipeptide antibodies that detect p30 at the surface of neuroblastoma cells and of brain neurons. *J Cell Biol*. 1988 Dec;107(6 Pt 1):2293-2305.
- Redondo S, Ruiz E, Santos-Gallego CG, Padilla E, Tejerina T. Pioglitazone induces vascular smooth muscle cell apoptosis through a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, transforming growth factor-beta1, and a Smad2-dependent mechanism. 2005. *Diabetes*. 54(3):811-7.
- Rehman KK, Bertera S, Bottino R, Balamurugan AN, Mai JC, Mi Z, Trucco M, Robbins PD. Protection of islets by in situ peptide-mediated transduction of the Ikappa B kinase inhibitor Nemo-binding domain peptide, 2003. *J Biol Chem*. 14;278(11):9862-8.
- Reinard T. *Molekularbiologische Methoden*. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, 2010; S. 125.

- Riachy R, Vandewalle B, Kerr Conte J, Moerman E, Sacchetti P, Lukowiak B, Gmyr V, Bouckenooghe T, Dubois M, Pattou F. 1,25-dihydroxyvitamin D3 protects RINm5F and human islet cells against cytokine-induced apoptosis: implication of the antiapoptotic protein A20. 2002. *Endocrinology*. 143(12):4809-19.
- Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1999 Oct 7;341(15):1127-33.
- Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem*. 2004 Oct 8;279(41):42351-4.
- Ruiz E, Redondo S, Gordillo-Moscoso A, Tejerina T. Pioglitazone induces apoptosis in human vascular smooth muscle cells from diabetic patients involving the transforming growth factor-beta/activin receptor-like kinase-4/5/7/Smad2 signaling pathway, 2007. *J Pharmacol Exp Ther*. 321(2):431-8.
- Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med*. 1999 Nov;107(5):489-506.
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002 Jul 11;418(6894):191-5. Schranz DB, Lernmark A., 1998. Immunology in diabetes: an update. *Diabetes Metab Rev*. 14(1):3-29.
- Shu Zhang, Jixin Zhong, Ping Yang, Feili Gong, Cong-Yi Wang. HMGB1, an innate alarmin, in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Int J Clin Exp Pathol* 2010;3(1):24-38.
- Stern D, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002 Dec 7;54(12):1615-25.
- Sun KK, Ji C, Li X, Zhang L, Deng J, Zhong N, Wu XY. Overexpression of high mobility group protein B1 correlates with the proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma cells. *Mol Med Rep*. 2013 Mar 6. doi: 10.3892/mmr.2013.1362.
- Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*. 2000 May 18;405(6784):354-60.
- Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, Inoue K, Yamada S, Ijiri K, Matsunaga S, Nakajima T, Komiya S, Maruyama I. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum*. 2003 Apr;48(4):971-81.
- Thomas JO, Stott K. H1 and HMGB1: modulators of chromatin structure. *Biochem Soc Trans*. 2012 Apr;40(2):341-6.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6.

- Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar TR. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med*. 2005 Apr 4;201(7):1135-43.
- Ulfgren AK, Grundtman C, Borg K, Alexanderson H, Andersson U, Harris HE, Lundberg IE. Down-regulation of the aberrant expression of the inflammation mediator high mobility group box chromosomal protein 1 in muscle tissue of patients with polymyositis and dermatomyositis treated with corticosteroids. *Arthritis Rheum*. 2004 May;50(5):1586-94.
- Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006 Jun;17(3):189-201.
- Ulloa L, Tracey KJ. The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends Mol Med*. 2005 Feb;11(2):56-63.
- Vasudevan AR, Balasubramanyam A. Thiazolidinediones: a review of their mechanisms of insulin sensitization, therapeutic potential, clinical efficacy, and tolerability. *Diabetes Technol Ther*. 2004 Dec;6(6):850-63.
- Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1999;103(7):931-43.
- Volz HC, Seidel C, Laohachewin D, Kaya Z, Müller OJ, Pleger ST, Lasitschka F, Bianchi ME, Remppis A, Bierhaus A, Katus HA, Andrassy M. HMGB1: the missing link between diabetes mellitus and heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2010 Nov;105(6):805-20.
- Völpl K, Brezniceanu ML, Bösser S, Brabletz T, Kirchner T, Göttel D, Joos S, Zörnig M. Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with an elevated level of the antiapoptotic c-IAP2 protein in human colon carcinomas. *Gut*. 2006 Feb;55(2):234-42.
- Wang AP, Li X, Zheng Y, Liu BL, Huang G, Yan X, Liu Z, Zhou Z. Thiazolidinediones protect mouse pancreatic β -cells directly from cytokine-induced cytotoxicity through PPAR γ -dependent mechanisms. *Acta Diabetol*. 2013 Apr;50(2):163-73.
- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 1999 Jul 9;285(5425):248-51.
- Wang H, Yang H, Czura CJ, Sama AE, Tracey KJ. HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Nov 15;164(10 Pt 1):1768-73.
- Gong W, Zheng Y, Chao F, Li Y, Xu Z, Huang G, Gao X, Li S, He F. The anti-inflammatory activity of HMGB1 A box is enhanced when fused with C-terminal acidic tail. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:915234.
- Wei L, MacDonald TM, Mackenzie IS. Pioglitazone and bladder cancer: a propensity score matched cohort study. *Br J Clin Pharmacol*. 2013 Jan;75(1):254-9.

- Yan W, Chang Y, Liang X, Cardinal JS, Huang H, Thorne SH, Monga SP, Geller DA, Lotze MT, Tsung A. High-mobility group box 1 activates caspase-1 and promotes hepatocellular carcinoma invasiveness and metastases. *Hepatology*. 2012 Jun;55(6):1863-75.
- Yang H, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 rediscovered as a cytokine. *Shock*. 2001 Apr;15(4):247-53.
- Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, Susarla SM, Ulloa L, Wang H, DiRaimo R, Czura CJ, Wang H, Roth J, Warren HS, Fink MP, Fenton MJ, Andersson U, Tracey KJ. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 6;101(1):296-301.
- Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol*. 2005 Jul;78(1):1-8. Epub 2005 Feb 25.
- Yao X, Zhao G, Yang H, Hong X, Bie L, Liu G. Overexpression of high-mobility group box 1 correlates with tumor progression and poor prognosis in human colorectal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010 May;136(5):677-84.
- Ye DZ, Tai MH, Linning KD, Szabo C, Olson LK. MafA expression and insulin promoter activity are induced by nicotinamide and related compounds in INS-1 pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2006 Mar;55(3):742-50.
- Zangen DH, Bonner-Weir S, Lee CH, Latimer JB, Miller CP, Habener JF, Weir GC. Reduced insulin, GLUT2, and IDX-1 in beta-cells after partial pancreatectomy. *Diabetes*. 1997 Feb;46(2):258-64.
- Zeender E, Maedler K, Bosco D, Berney T, Donath MY, Halban PA. Pioglitazone and sodium salicylate protect human beta-cells against apoptosis and impaired function induced by glucose and interleukin-1beta. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Oct;89(10):5059-66.
- Zhou X, Lu X. The role of oxidative stress in high glucose-induced apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013 Aug 1;238(8):898-902.
- Zini E, Osto M, Franchini M, Guscetti F, Donath MY, Perren A, Heller RS, Linscheid P, Bouwman M, Ackermann M, Lutz TA, Reusch CE. Hyperglycaemia but not hyperlipidaemia causes beta cell dysfunction and beta cell loss in the domestic cat. *Diabetologia*. 2009 Feb;52(2):336-46.

Anhang

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität in Marburg waren die Damen und Herren:

Alter, Arnold, Aumüller, Bals, Basler, Bastians, Bauer, Baum, Barth, Becker, Behr, Bertalanffy, Brehm, Buchholz, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, del Rey, Dietrich, Dodel, Ebel, Eilers, Ellenrieder, Engenhart-Cabillic, Feuser, Funck, Geus, Göke, Görg, Gotzen, Gress, Grimm, Gudermann, Grzeschik, Hamer, Hasilik, Hegele, Hellmeyer, Hertl, Herzum, Hesse, Hinrichs, Hofbauer, Höffken, Hofmann, Hoyer, Jacob, Jungclas, Kann, Kern, Klaus, Klenk, Klose, Koch, Köhler, König, Koolman, Krebber, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kühne, Kuhlmann, Lang, Lankat-Buttgereit, Lemke, Lill, Löffler, Lohoff, Lutz, Maier, Maisch, Mann, Michl, Moll, Möller, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Plant, Printz, Radsak, Ramaswamy, Rausch, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Sattler, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneider, Seitz, Seyberth, Sommer, Steiniger, Steinkamp, Stiasny-Kolster, Stiletto, Suske, Tebbe, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wilke, Wulf, Zielke.

Danksagung

Ich möchte diese Zeilen dazu nutzen, denjenigen Menschen zu danken, die direkt oder indirekt am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Göke, meinem Doktorvater, ehemaliger Professor am Universitätsklinikum Marburg in Fachrichtung Endokrinologie, der mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation in seiner Abteilung zu erstellen, bedanken. Zusätzlich möchte ich mich für die raschen Rückmeldungen und die fachliche Bewertung meiner Arbeit bedanken.

Großer Dank gilt Frau Apl. Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Lankat-Buttgereit, die mich mit ihrer kompetenten Beratung und großem Engagement unterstützt hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dorothee Bonorden, die bei methodischen Fragen und Hilfeleistungen stets zur Stelle gewesen war.

Im Verlauf der Arbeit an der Dissertation kommt auch medizinisch technischen Assistenten und Assistentinnen besonderer Anteil am Gelingen dieser Arbeit zu. Diese möchte ich ebenfalls erwähnt haben und ihnen danken: Eleni Archontidou-Aprin, Harald Schmidt, Ecatarina Oplesch, Ute und Anne Boßhammer.

Meinen Mitdoktoranden Krista Saavedra Blume, Susanne Heipel, Sabine Müller, Nadejda Monsefi, Harald Curth und Lilian Sewing danke ich für die gute Zeit.

Besonderer Dank gilt meinem Ehemann Candan Depboyu, der mich vom ersten bis zum letzten Tag unterstützt hat. Danke für die beständige ermutigende Motivation! Danke für die wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen und für die Hilfe bei der Betreuung unserer Kinder.

Schließlich möchte ich den Menschen danken, die mir das alles letztendlich möglich gemacht haben. Für die Unterstützung auf den vielen Wegen, die ich bis zu diesem Punkt gegangen bin, bedanke ich mich bei meinen Eltern Nadire und Emir Citak, meiner Schwester Alev und bei meinem Bruder Hakan Citak.